

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

УДК 543

№ государственной регистрации 01201064162

Инв.№ 0365-5

УТВЕРЖДАЮ

Зам. декана по научной работе

д-р хим. наук, профессор

\_\_\_\_\_ А.А.Бучаченко

«20» октября 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: «Создание новых электродов для  
вольтамперометрического определения органических соединений различных  
классов; получение высокоэффективных сорбентов для  
ионохроматографического определения концентрации ионов, в том числе  
органических»  
(итоговый, этап № 5)

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, заклучение, 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.	_____		(разделы 2.4 и 2.5)
с.н.с.	_____	Цизин Григорий Ильич Тихомирова Татьяна Ивановна	(разделы 1.1.4. и 2.2)
в.н.с.	_____	Плетнев Игорь Владимирович	разделы (1.1.1. и 2.2)
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 1.1.3. и 2.4)
в.н.с.	_____		(разделы 1.1.5. и 2.6)
проф.	_____	Алов Николай Викторович	(разделы 1.1.2. и 2.3)
доц.	_____	Шпигун Олег Алексеевич Иванов Александр Вадимович	(разделы 1.1.4. и 2.5)
с.н.с.	_____	Ананьева Ирина Алексеевна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
в.н.с.	_____	Пирогов Андрей Владимирович	(разделы 1.1.2. и 2.3)
в.н.с.	_____	Смоленков Александр Дмитриевич	(разделы 1.1.2. и 2.3)
с.н.с.	_____	Статкус Михаил Александрович	(разделы 1.1.3 и 2.4)
н.с.	_____	Апяри Владимир Владимирович	(разделы 1.1.3 и 2.4)
с.н.с.	_____	Родин Игорь Александрович	разделы (1.1.2. и 2.3)
н.с.	_____	Затираха Александра Валерьевна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
м.н.с.	_____	Прохорова Александра Федоровна	(разделы 1.1.3. и 2.4)
ст. преп.	_____	Моногарова Оксана Викторовна	(разделы 1.1.3. и 2.4)

инж.		Кочук Елена Валентиновна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
м.н.с.		Бендрышев Александр Александрович	(разделы 1.1.2. и 2.3)
инж.		Самарина Татьяна Олеговна	(разделы 1.1.4. и 2.5) (раздел 2.5)
асп.		Удалова Алла Юрьевна	(разделы 1.1.4. и 2.5)
асп.		Борисова Дина Рашидовна	(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.		Разважная Олеся Владимировна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Ржевская Александра Вячеславовна	(разделы 1.1.1. и 2.2) (разделы 1.1.2. и 2.3)
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) (разделы 1.1.2. и 2.3)
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)
асп.		Архипова Виктория Владиславовна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
асп.		Костромских Анастасия Андреевна	(разделы 1.1.3. и 2.4)
студ.		Терентьева Екатерина Александровна	(разделы 1.1.4. и 2.5)
студ.		Дубенский Александр Сергеевич	(разделы 1.1.4. и 2.5)
студ.		Осипенко Сергей Владимирович	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Федорова Ирина Александровна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
студ.		Натчук Сергей Владимирович	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Толмачева Вероника Владимировна	(разделы 1.1.1. и 2.2)

студ.	_____	Паутова Алиса Константиновна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.	_____	Панкова Татьяна Андреевна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.	_____	Назаренко Дмитрий Владимирович	разделы (1.1.1. и 2.2)
студ.	_____	Шаранов Павел Юрьевич	(разделы 1.1.5. и 2.6)
студ.	_____	Лазов Михаил Александрович	(разделы 1.1.5. и 2.6)
нормоконтролер	_____	Барбалат Юрий Александрович	

## РЕФЕРАТ

Отчет 104 с., 31 рис., 15 табл., 89 источников.

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

Этап № 5. Создание новых электродов для вольтамперометрического определения органических соединений различных классов; получение высокоэффективных сорбентов для ионохроматографического определения концентрации ионов, в том числе органических.

Ключевые слова: ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ, СОРБЕНТЫ, АНТИОКСИДАНТЫ, ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИЕ, ФТОРУГЛЕРОДНЫЕ ПЛЕНКИ

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

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

Разработаны четыре лабораторных образца химически модифицированных электродов для вольтамперометрического анализа с пределами обнаружения ( $C_{\min}$ ) не выше  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  М.

Разработан лабораторный образец сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии, обеспечивающий разделение смеси фторида, хлорида, нитрита, нитрата, фосфата и сульфата менее, чем за 20 мин, с эффективностью не менее 20000 ТТ/м. Размер частиц сорбента находится в пределах 3,5-5 мкм.

Разработана методика селективного определения отдельных групп антиоксидантов (включая биофлавоноиды) в растительных экстрактах и пищевых продуктах, обеспечивающая определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-5}$  М.

Разработана методика полупрепаративного хроматофокусирования 8-10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием, обеспечивающая разрешение хроматографических пиков не менее 0,75-1,0.

Предложен способ установления влияния добавки гексафторида серы (0-40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок с точностью не хуже 0,1 нм/с, отношение концентраций F/C с точностью не хуже 0,1 % и соотношение химических связей C-F<sub>3</sub>, C-F<sub>2</sub>, C-F, C-CFn, C-C с точностью не хуже 1,0 % во фторуглеродных пленках.

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 защищены 2 кандидатских диссертации, опубликованы 19 статей в высокорейтинговых журналах.

## СОДЕРЖАНИЕ

	Страница
1. ВВЕДЕНИЕ	8
1.1. Оценка современного состояния решаемой проблемы (Создание новых электродов для вольтамперометрического определения органических соединений различных классов; получение высокоэффективных сорбентов для ионохроматографического определения концентрации ионов, в том числе органических)	8
1.1.1. Разработка лабораторных образцов химически модифицированных электродов для вольтамперометрического определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот	8
1.1.2. Разработка лабораторного образца сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии	14
1.1.3. Разработка методики селективного определения отдельных групп антиоксидантов (например, биофлавоноидов) в растительных экстрактах и пищевых продуктах	20
1.1.4. Разработка методики полупрепаративного хроматофокусирования 8 – 10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием	24
1.1.5. Разработка способа установления влияния добавки гексафторида серы (0 – 40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок	26
1.1.6. Выводы к обзору литературы	28
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	28
2.1. Выбор направления исследований, методы решения задач	28
2.2. Разработка лабораторных образцов химически модифицированных электродов для вольтамперометрического определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и	34

гидроксикислот	
2.3. Разработка лабораторного образца сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии	42
2.4. Разработка методики селективного определения отдельных групп антиоксидантов (например, биофлавоноидов) в растительных экстрактах и пищевых продуктах	54
2.5. Разработка методики полупрепаративного хроматофокусирования 8-10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием	63
2.6. Разработка способа установления влияния добавки гексафторида серы (0 – 40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок	74
<b>3. СТАТИСТИЧЕСКИЕ И ФАКТОГРАФИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ О НАУКОМЕТРИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТАХ ВЫПОЛНЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОГО КОНТРАКТА</b>	<b>80</b>
3.1. Статьи, опубликованные по результатам выполнения государственного контракта	80
3.2. Кандидатские диссертации, защищенные по результатам выполнения государственного контракта	83
3.3. Список молодых специалистов, принимавших участие в выполнении государственного контракта	83
3.4. Сравнение полученных результатов с техническими характеристиками, заявленными в Техническом задании государственного контракта	86
3.5. Индикаторы и показатели	87
<b>4. ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЫНОЧНОГО ПОТЕНЦИАЛА РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ НИР</b>	<b>88</b>
<b>5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>89</b>

6. ЛИТЕРАТУРА	92
7. ПРИЛОЖЕНИЯ	99
7.1. Акты разработки лабораторных образцов и методик	100

## 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 лабораторных образцов химически модифицированных электродов для вольтамперометрического определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот

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 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.

Особенно интересно применение ИЖ в электрохимии в качестве электропроводящей среды для вольтамперометрии органических соединений. Широкое электрохимическое "окно" и высокая проводимость ИЖ делает их привлекательными для гибридного экстракционно-вольтамперометрического определения органических соединений непосредственно в фазе электропроводящего экстракта – ионной жидкости и ширину электрохимического «окна».

Важно, что можно использовать гидрофобные ИЖ для модифицирования поверхности твердых электродов, что открывает возможность накопления аналита при нулевом токе (вследствие экстракции его в модифицирующий слой ИЖ) и повышения чувствительности анализа.

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  $\text{PF}_6^-$  и  $\text{Tf}_2\text{N}^-$ , 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 [1]. 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 [2]. В работе, выполненной 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  $(CF_3CF_2)_3PF_3^-$  при сохранении такого же катиона  $C_1C_6Im^+$  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 [3]. 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.

Среди публикаций, посвящённых использованию ионных жидкостей в вольтамперометрии, можно выделить несколько направлений, которые вызывают в настоящее время наибольший интерес. Это использование ИЖ в качестве растворителей для осуществления электрохимических превращений в широком диапазоне потенциалов, модифицирование поверхности электродов тонким слоем ионной жидкости и использование композиционных полимерных и углеродных материалов на основе ионных жидкостей для создания модифицированных вольтамперометрических сенсоров для анализа водных растворов. Применению ИЖ в качестве проводящих органических сред для изучения электрохимических реакций было уделено внимание выше, потому далее рассмотрим подробнее возможности ионных жидкостей и материалов на их основе для модифицирования поверхности индикаторных электродов.

Модифицирование электродов (в большинстве случаев авторами используется стеклоуглеродный электрод) гелями на основе ионных жидкостей и углеродных нанотрубок активно используется при разработке чувствительных датчиков, позволяющих определять различные соединения в биологических жидкостях. Так, например, модифицирование стеклоуглеродного электрода гелем, содержащим 1-октил-3-метилимидазолия гексафторфосфат и углеродные нанотрубки, и использование фосфатного буфера в качестве фонового электролита позволило авторам [4] создать датчик, чувствительный к аденину и мочевиной

кислоте; пределы обнаружения составляют  $2,0 \cdot 10^{-6} M$  и  $9,0 \cdot 10^{-8} M$  соответственно. Разработанный сенсор использовали при определении мочевины в образцах мочи.

Как известно, ионные жидкости не только сами обладают каталитической активностью, но в некоторых случаях способны сохранять и увеличивать биологическую активность ферментов. Этот факт был использован при создании биосенсоров с использованием ионных жидкостей. Авторы [5] провели гидролиз тетраэтил-орто-силиката в среде 1-бутил-3-метилимидазолия тетрафторбората и полученную вязкую систему (золь-гель) использовали для иммобилизации пероксидазы из корней хрена. Авторы отмечают высокую стабильность фермента, иммобилизованного таким способом. Модифицирование поверхности стеклоглеродного электрода данным композиционным материалом позволило сконструировать амперометрический биосенсор, характеристики которого изучались методами циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии. Отмечается, что использование ферроцена в качестве медиатора электронного переноса позволяет повысить чувствительность определения и стабильность иммобилизованного фермента; градуировочный график определения пероксида водорода линеен в диапазоне концентраций 0,02-0,26 мМ, предел обнаружения составляет 1,1 мкМ. В то же время константа Михаэлис-Ментен для данной системы составляет 2,0 мМ, что указывает на широкую субстратную специфичность и невысокую селективность определения. Авторами подчеркивается возможность использования предложенного ими биосенсора для определения в потоке.

В работе [6] для иммобилизации пероксидазы из корней хрена авторы использовали полимерный композиционный материал на основе нафiona и 1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфата. Покрытие поверхности стеклоглеродного электрода данной композицией и исследование методами циклической вольтамперометрии, электрохимической импедансной спектроскопии, а также рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии показало, что данная композиция способна эффективно модифицировать поверхность стеклоглеродного электрода с высокой адгезией и может быть использована в дальнейшем при создании пероксидазного амперометрического биосенсора.

С целью создания биосенсора, чувствительного к содержанию глюкозы, авторы [7] иммобилизовали глюкозооксидазу в микрокапсулах скоагулированной

полимерной ионной жидкости на основе диалкилимидазолиевого катиона. Для этого 1-винил-3-этилимидазолия бромид был выбран в качестве мономера и N,N-диметилен-бис-акриламид в качестве сшивающего агента. После приготовления эмульсии и проведения полимеризации бромид-ион замещали на  $BF_4^-$ ,  $CF_3SO_2^-$ ,  $Tf_2N^-$ ,  $(CF_3CF_2SO_2)_2N^-$  или додецилбензилсульфонат, что приводило к коагуляции полимера в микрочастицы, способные эффективно иммобилизовывать глюкозооксидазу. Очевидно, подобный способ иммобилизации фермента может использоваться при создании биосенсоров на глюкозу. Авторы подчёркивают, что отклик модифицированного электрода напрямую зависит от типа выбранного противоиона – так, аналитический сигнал растёт в ряду  $Br^- > BF_4^- > (CF_3CF_2)_2N^-$ .

Возможность иммобилизации лакказы в гелях «ионная жидкость-углеродные нанотрубки» на поверхности графитового электрода позволяет создать амперометрический сенсор, высокочувствительный к кислороду, а также к ионам-ингибиторам лакказы: фториду, хлориду и бромиду. В работе [8] изучали электрохимические свойства гемоглобина и фермента каталазы, адсорбированных на геле «1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфат – углеродные нанотрубки»; гель на основе ионной жидкости использовался в качестве модификатора поверхности стеклоуглеродного электрода. Длительное сохранение активности ферментов позволяет создавать высокочувствительные и удобные в работе биосенсоры для определения кислорода (в случае гемоглобина) и пероксида водорода (в случае каталазы).

Авторами [9] проведено сопоставление электрохимических характеристик фермента глюкозооксидазы, иммобилизованной как на гелях «ионная жидкость-углеродные нанотрубки», так и просто на поверхности углеродных нанотрубок. Обнаружено, что в первом случае значительно выше скорость электронного переноса, а также обратимость процесса окисления глюкозы. Авторы полагают, что именно сочетание ионной жидкости (использован гексафторфосфат 1-бутил-3-метилимидазолия) в качестве связующего с одной стороны и углеродных нанотрубок с другой обеспечивают синергетический эффект повышения скорости электронного переноса.

Использование предварительного накопления в течение 3-х минут позволило авторам [10] детектировать мочевины с наномолярным пределом обнаружения на

стеклоуглеродном электроде, модифицированном гелем «BMImPF<sub>6</sub>-углеродные нанотрубки». В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор с pH=4,0; пик окисления мочевины наблюдали при потенциале 0,49 В относительно каломельного электрода. Разработанный электрод использован при анализе образцов мочи. Авторы отмечают, что поверхность электрода легко очищается электрохимически и электрод готов к повторному измерению уже через несколько минут.

В работе [11] описан вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного гелем «1-октил-3-метилимидазолия гексафторфосфат-углеродные нанотрубки». Методом циклической вольтамперометрии авторы изучали электроокисление допамина. Установлено, что толщина модифицирующего слоя определяет величину тока заряжения, что следует учитывать при создании высокочувствительного датчика. Показано, что при pH=7,08 допамин может быть определен в присутствии аскорбиновой и мочевой кислот. Так, пик аскорбиновой кислоты наблюдается при меньшем, а пик мочевой кислоты – при большем потенциале относительно потенциала пика окисления допамина. Градуировочный график определения допамина на данном электроде линеен в диапазоне концентраций 1-100 мкМ,  $C_{min}=1,0 \cdot 10^{-7} M$ . Электрод использован для определения допамина в плазме крови. Хорошая селективность определения допамина в присутствии мочевой и аскорбиновой кислот позволяет применять его для анализа образцов мочи. Для повышения чувствительности определения и снижения предела обнаружения рекомендуется проводить определение в дифференциально-импульсном режиме с использованием фосфатного буфера.

Как можно видеть, сочетание «ионные жидкости-углеродные нанотрубки» является многообещающим для разработки простых и чувствительных вольтамперометрических сенсоров. В то же время использование модифицирующих композиций на основе ионных жидкостей и других, более доступных углеродных материалов также представляет значительный интерес. Так, возможно использовать ионные жидкости в качестве токопроводящих связующих графитовых паст. На основе подобных композиций сконструирован угольно-пастовый электрод, содержащий в качестве катализатора восстановления нитрита

полиоксомолибдат [12]. Авторами [13] на примере исследования редокс-пар феррицианид/ферроцианид и НАД<sup>+</sup>/НАДН, а также катехола, допамина и аскорбиновой кислоты показаны преимущества использования угольно-пастовых электродов на основе гексафторфосфатов 1-бутил-3-метилимидазолия и 1-октил-3-метилимидазолия в качестве связующих, альтернативных обычно используемым (например, парафину) – плотность тока, скорость электронного переноса в случае ионных жидкостей гораздо выше. Отмечено, что в зависимости от используемого фонового электролита и кислотности анализируемых растворов ионные жидкости способны проявлять ионообменные свойства либо обуславливать адсорбцию аналита на поверхности электрода. Исследователи той же научной группы показали применимость графитовых паст на основе ионных жидкостей для создания электродов, пригодных для вольтамперометрического определения микромолярных содержаний допамина, мочевой и аскорбиновой кислот [14], замещённых фенолов [15].

Стоит отметить, что в большинстве случаев ионные жидкости и композиционные материалы на их основе используются либо для модифицирования поверхности стеклоуглеродного электрода, либо для изготовления пастовых электродов. В то же время углеродсодержащие композиты на основе ионных жидкостей также могут применяться для модифицирования рабочих поверхностей индикаторных электродов. Так, авторы [16] использовали графитовые пасты на основе 1-бутил-3-метилимидазолия для модифицирования Au-электрода и количественного определения прометазина.

#### 1.1.2. Разработка лабораторного образца сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии

При проведении хроматографического разделения выбор неподвижной фазы играет определяющую роль, поскольку она определяет селективность и эффективность разделения. Основными составляющими, влияющими на хроматографические свойства ионообменника, являются матрица (ее природа, диаметр частиц, их монодисперсность), а также природа функциональной группы и способ закрепления последней к матрице.

*Матрицы анионообменников для ионной хроматографии.* В современной ИХ в качестве матриц для ионообменников наибольшее распространение получили сополимеры стирола и дивинилбензола [17]. В основу синтеза таких матриц положена реакция полимеризации стирола, в которой дивинилбензол играет роль сшивающего агента. Среди синтетических полимеров ПС-ДВБ выделяется очень хорошими физическими и химическими свойствами. Благодаря высокой механической устойчивости и практически полному отсутствию набухания в органических растворителях сополимеры стирола и дивинилбензола с высокой степенью сшивки получили широкое распространение в качестве неподвижных фаз в современной ионной хроматографии и в последних работах [18 – 26] предпочтение отдается именно таким матрицам.

Помимо степени сшивки свойства ионообменника зависят также от размера полимерных частиц. Наибольшая эффективность достигается при использовании частиц с наименьшим диаметром. Это связано с тем, что при работе с ионообменной смолой, состоящей из мелких частиц, быстрее достигается равновесное состояние, повышается эффективность данного объема смолы, улучшается разделение. Поэтому в последнее время основное внимание уделяется разработке анионообменников с размером частиц не более 10 мкм. Высокая эффективность колонки зависит также от монодисперсности частиц смолы [27].

*Функциональные группы анионообменников.* Синтез ионообменников предполагает введение в каркас матрицы требуемого типа ионообменных групп. В литературе встречаются методики синтеза с использованием различных аминирующих реагентов – в основном, аминов с алкильными или алкоксильными заместителями и замещенных диаминов.

Строение аминов, используемых при аминировании матрицы, существенно влияет на характеристики анионообменников. В работе [28] показано, что при варьировании длины алкильного радикала у атома азота в функциональной группе повышается избирательность сорбентов к более поляризуемым анионам. Удерживание двухзарядных анионов снижается, а удерживание анионов слабых кислот практически не зависит от размера алкильных групп. Следовательно, варьируя длину алкильного радикала, можно добиться повышения селективности разделения сильно удерживаемых анионов.

Замещение одной или более алкильных групп в анионообменнике на более полярный заместитель оказывает существенное влияние на селективность. Классические анионообменники с функциональной группой  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  имеют намного более низкое сродство к стандартным анионам, чем ионообменники с функциональной группой  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ .

Авторы [29] провели сравнение нескольких сорбентов на основе гидроксиэтилметакрилатных сополимеров с различными функциональными группами, отличающимися по полярности и основности. Установлено, что с повышением полярности функциональной группы коэффициенты селективности для ионов одного заряда возрастают, тогда как для ионов разного заряда – уменьшаются. Зависимости между селективностью сорбента и его основностью не обнаружено.

Авторы статьи [30] проводили сравнение ионохроматографических свойств анионообменников, полученных при аминировании хлорметирированного ПС-ДВБ N,N-диметилгидразином (НДМГ) и различными алкиламинами. В работе продемонстрировано, что с увеличением гидрофильности функциональной группы увеличивается эффективность ионообменной смолы, и анионообменник, аминированный НДМГ, с наиболее гидрофильной функциональной группой в данных условиях характеризуется наилучшей селективностью и эффективностью.

В работах [31, 32] показана возможность применения соединений класса оксиранов для получения анионообменников на основе полимеров различного типа. Например, авторы работы [32] использовали метиламин и 1,4-бутандиолдиглицеидоловый эфир для модифицирования полимера на основе 1,4-ди(2-гирокси-3-метакрилоксипропокси)фенола, в результате были получены сорбенты, содержащие 3, 5, 7 и 11 слоев с четвертичными аммониевыми группами. Как отмечают авторы, селективность сорбента улучшается по мере увеличения количества слоев. Однако при этом увеличивается степень размывание пиков бромида и нитрата. В целом, результаты данного исследования свидетельствуют о перспективности использования эпоксидных соединений для простого и быстрого модифицирования полимерных матриц.

*Методы получения ковалентно-модифицированных полимерных анионообменников. Хлорметирирование. Хлорметирирование матрицы с*



последующим аминированием третичными аминами является классическим методом получения анионообменников на основе сополимеров стирола с дивинилбензолом.

Первая работа, посвященная хлорметилированию полистирольной матрицы, опубликована в 1953 году [33]. Модифицирование проводили хлорметиловым эфиром в присутствии хлорида цинка или четыреххлористого олова в качестве катализаторов. Несмотря на то, что такой метод синтеза иногда применяется и в настоящее время, использование хлорметилового эфира для закрепления функциональных групп на поверхности сорбента имеет существенный недостаток, связанный с высокой токсичностью данного реагента [34], в связи с чем его использование ограничено. В настоящее время известно достаточно много альтернативных методик хлорметилирования, которые предполагают использование менее токсичных реагентов [28, 35 – 39].

Простота хлорметилирования полимерных матриц позволяет легко вводить большое количество функциональных групп, поэтому такой способ модифицирования часто используется в синтезе анионообменников. Однако этот метод имеет ряд недостатков. Во-первых, велика вероятность протекания побочных реакций. Во-вторых, прямое присоединение к полимерному каркасу через метиленовую группу снижает подвижность функциональной группы, а также, в некоторых случаях, затрудняет ее доступность реагентам и растворителям. Кроме того, хлорметилирование смол на основе ПС-ДВБ часто сопровождается дополнительной сшивкой полимерных цепей [40].

*Алкилирование по Фриделю-Крафтсу.* Метод алкилирования полимерной матрицы *n*-бромалкеном в присутствии трифторметансульфоновой кислоты в качестве катализатора получил широкое распространение. Основным преимуществом данного подхода является возможность варьировать количество групп  $-CH_2-$ , т.е. длину спейсера, соединяющего функциональную группу с поверхностью матрицы, и таким образом изменять свойства получаемых сорбентов.

Авторами [41] получен ряд анионообменников с триметиламмониевой функциональной группой с разной длиной спейсера. Установлено, что пространственно удаляя функциональную группу от ядра сорбента, можно

добиться существенного улучшения хроматографических свойств ионообменников, в частности, эффективности. При этом относительное удерживание анионов слабых кислот и двухзарядных анионов практически не зависит от расстояния между полимерной матрицей и функциональной группой. Однако для поляризуемых анионов (нитрата, хлората, иодида) с увеличением длины спейсера наблюдается улучшение формы пика и уменьшение относительного удерживания. С этой точки зрения наилучшим алкилирующим агентами являются н-бромалкены со спейсером, содержащим три и более атомов углерода.

В ряде работ [19, 42 – 45] в качестве алкилирующего агента использовали 5-бром-1-пентен, а дальнейшее превращение осуществляли путем аминирования N-метилдиэтаноломином или 2-диметилэтаноломином.

*Ацилирование по Фриделю-Крафтсу.* В последнее время все больше работ посвящено синтезу сорбентов через стадию ацилирования по Фриделю-Крафтсу. Реакция ацилирования проходит в присутствии катализаторов, которыми обычно являются кислоты Льюиса, а ацилирующими агентами могут выступать ангидриды и хлорангидриды кислот, а также различные их производные.

Также как и алкилирование по Фриделю-Крафтсу, ацилирование позволяет получать сорбенты с различной длиной спейсера, отделяющего функциональную группу от матрицы. В работе [46] для изучения влияния длины спейсера на ионохроматографические свойства ионообменников методом ацилирования синтезирован ряд ионообменных смол, содержащих три, четыре и пять атомов углерода между функциональной группой и ядром сорбента. В качестве аминировочного агента использовали триметиламин. Авторами отмечено, что при увеличении длины цепочки между функциональной группой и ядром анионообменника улучшается селективность сорбентов. Кроме того, увеличение расстояния между функциональной группой и ядром сорбента приводит к получению более узких и более симметричных пиков.

Авторами [45] предложен синтез сорбентов, в которых ионогенные группы закреплены на полимерном каркасе посредством алкильных и карбонильных цепей и проведено сравнение полученных анионообменников (рис. 1):

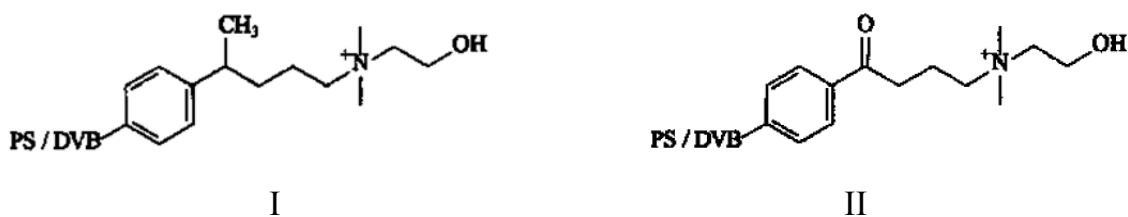


Рисунок 1 – Структурные формулы сорбентов, содержащих в цепи алкил-радикал (I) и карбонильную группу (II) [45].

Сравнение хроматографических характеристик синтезированных ионообменников показало, что при использовании щелочных элюентов строение закрепляющего фрагмента оказывает существенное влияние на хроматографическое поведение определяемых компонентов. При наличии карбонильной группы процесс разделения ускоряется по сравнению с таковым в случае алкилзамещенных цепей.

В работах [26] и [47] описан новый способ получения сорбентов, который заключается в ацилировании матрицы по Фриделю-Крафтсу и последующем присоединении первичной аминогруппы по реакции Льюкарта. Полученный слабоосновный анионообменник при помощи реакции алкилирования можно перевести в сорбент, содержащий третичные аминогруппы, либо в соответствующий сильноосновный анионообменник, содержащий четвертичные функциональные группы, если использовать избыток алкилирующего агента и основания. Схема реакций представлена на рис. 2.

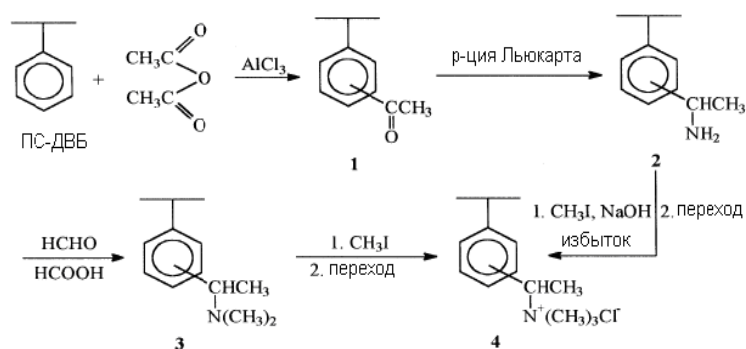


Рисунок 2 – Схема синтеза анионообменников на основе ПС-ДВБ [47].

Как видно из представленных данных, строение функциональной группы оказывает существенное влияние на хроматографические свойства анионообменников. Улучшения эффективности сорбента можно добиться за счет

повышения гидрофильности функциональной группы и ее пространственного удаления от матрицы. Введение полярных заместителей также влияет на селективность разделения, а увеличение длины спейсера приводит к улучшению формы пика и уменьшению относительного удерживания поляризуемых анионов, таких как нитрат, бромид, хлорат и иодид.

1.1.3. Разработка методики селективного определения отдельных групп антиоксидантов (например, биофлавоноидов) в растительных экстрактах и пищевых продуктах

*Методы определения антиоксидантов, в частности биофлавоноидов.* Для определения антиоксидантной активности (АОА) отдельных соединений и сложных смесей, в том числе растительных экстрактов, предложен ряд химических методов. Среди спектрофотометрических наиболее распространены методы, основанные на получении устойчивых окрашенных комплексов, образовании катион-радикалов (таких как 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоуксидота), или АБТС) [48] или стабильных радикалов (например, 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил, или ДФПГ) [49]. Далее эти соединения взаимодействуют с антиоксидантом. Чаще всего используют генерацию устойчивого окрашенного катион-радикала в системе АБТС – пероксид водорода – пероксидаза с последующим его взаимодействием с антиоксидантом, приводящим к уменьшению светопоглощения [48]. Разработаны усовершенствованные способы получения АБТС-радикала: взаимодействием исходного АБТС с радикалом феррилмиоглобина, который образуется в результате реакции метмиоглобина с пероксидом водорода [50], окислением АБТС оксидом марганца(IV) [51] и персульфатом [52].

Есть целый ряд единиц – количественных характеристик АОА. Чаще всего АОА выражают в единицах ТЕАС (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), принимая тролокс за эталонный антиоксидант [53]. Некоторые методики дают завышенные результаты при определении АОА вследствие взаимодействия реагента с соединениями, не обладающими антиоксидантной активностью. Так, в методе с использованием реактива Фолина, основанном на подавлении окраски

восстановленной формы этого реактива, помимо антиоксидантов окисляются, например сахара [54]. Метод FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) [55] основан на восстановлении Fe(III) до Fe(II). Предложено несколько соединений, способных восстанавливаться в присутствии антиоксиданта, например, неокрашенный Fe(III)-трипиридилтриазиновый комплекс, переходящий в комплекс Fe(II) голубого цвета. Методика проста и экспрессна, однако окрашенный комплекс формируется в кислой среде (pH 3.6), что намного ниже физиологического pH. Кроме того, методика не позволяет определить антиоксиданты, ограниченно растворимые в воде. Метод ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) [56] основан на измерении не светопоглощения, а флуоресценции (например, флуоресцеина). В присутствии антиоксидантов время флуоресценции увеличивается вследствие защитного действия антиоксидантов; площадь между кривыми до и после добавления антиоксиданта соответствует величине AOA.

Названные методы принципиально не сложны, однако требуют времени и соблюдения ряда условий на стадии получения окрашенных радикалов и при их хранении. Некоторые методики сложны в приборном оснащении и поэтому мало подходят для массового анализа. Кроме того, результаты, полученные различными методами, не всегда сопоставимы, поскольку чувствительность определения индивидуальных антиоксидантов с помощью разных индикаторных реакций различна. В настоящее время нет единого стандарта для количественного определения антиоксидантов [57], что затрудняет сравнение результатов, полученных различными методами.

*Методы селективного выделения низкомолекулярных органических аналитов, в частности биофлавоноидов.* Молекулярный импринтинг – метод получения селективных полимерных материалов, основанный (в традиционном и до сих пор наиболее распространенном варианте) на полимеризации мономера (обычно акрилового или органосилана) в присутствии сшивателя (для кремнесодержащих полимеров сшиватель не нужен) и порогенного растворителя. При этом в полимеризационную смесь вводят будущий аналит, называемый темплатом. После полимеризации и вымывания темплата получают импринтированный полимер, в котором образовались молекулярные отпечатки, комплементарные молекулам темплата.

Полимеризацию при импринтинге обычно проводят в массе. Недостатки такого метода – получение слитка полимера и необходимость его измельчения и разделения на фракции; получаемый мелкодисперсный сорбент неудобен для использования как в статическом, так и в динамическом вариантах сорбции, а крупнодисперсный – создает диффузионные ограничения при сорбции аналита. Сорбент же, получаемый в виде тонкой мембраны, не требует измельчения и рассеивания, а вымывание темплата происходит быстрее.

Полимеризацию в молекулярном импринтинге в массе обычно инициируют термически (чаще всего 2,2'-азо-*бис*-изобутиронитрилом – АИБН), термостатируя смесь в течение 12–24 ч. Более экспрессна фотохимически инициируемая полимеризация, проводимая в присутствии АИБН (что более длительно) или специальных фотоинициаторов.

Один из наиболее распространенных пищевых биофлавоноидов – кверцетин, на примере которого (и в меньшей степени – на примере нарингенина и рутина) большинство исследователей и разрабатывали подходы к селективному выделению биофлавоноидов. Для выделения биофлавоноидов предложен ряд сорбентов и мембран, полученных методом молекулярного импринтинга. Импринтинг-факторы (отношение степеней извлечения аналита при использовании импринтированного материала и материала, полученного в отсутствие темплата) и селективность получаемых сорбентов по отношению к другим биофлавоноидам не особенно высоки, что заставляет искать новые подходы. Так, предложено проводить импринтинг биофлавоноидов в присутствии ионов металлов (например,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) [58, 59]. Авторы этих работ считают, что металл образует связи одновременно и с полимером (в качестве мономера использовали метакриловую кислоту (МАК) или 4-винилпиридин), и с темплатом. Однако в таком случае сорбция темплата или (в случае мембраны) его перенос – должны существенно улучшаться в присутствии этого металла, что и наблюдается [58], однако не во всех случаях [59].

Упомянутый способ получения сорбента с молекулярными отпечатками кверцетина [59] основан на сополимеризации МАК и ЭГДМА в присутствии комплекса кверцетина с медью(II). Такой способ длителен: для приготовления самой смеси требовалось не менее 2 ч, а полимеризацию проводили в течение 12 ч при 60°C; для сорбции кверцетина требовалось от 20 до 240 мин. Полученный

полимер позволял отделить кверцетин от нарингенина и рутина с факторами разделения 7.2 и 5.4, соответственно, а импринтинг-фактор был равен 4. Другая методика получения сорбента с молекулярными отпечатками кверцетина основана на сополимеризации акриламида и ЭГДМА. Полимеризацию смеси, содержащей ацетон в качестве растворителя, проводили в течение 24 ч при 60°C. Сорбцию темплата проводили в течение 1 ч. Полимер характеризовался следующими факторами разделения: кверцетин/рутин (30), кверцетин/нарингенин (1), кверцетин/нарингин (18), кверцетин/морин (7), кверцетин/хризин (0,8). Импринтинг-фактор был равен 6 [60].

Наилучший способ диффузионного выделения кверцетина основан на использовании импринтированной мембраны [11], для получения которой смесь 4-винилпиридина, ЭГДМА, полиэтиленгликоля (ПЭГ), порообразователя и темплата (кверцетина) полимеризовали с фотохимическим иницированием в присутствии АИБН в качестве инициатора. В смесь также вводили ацетат цинка. Для гомогенизации применяли ультразвук дважды по 2 ч для полного растворения всех компонентов, смесь дегазировали пропусканием тока азота. В качестве подложки использовали нетканый полипропиленовый материал. Мембрану зажимали между двумя стеклами и облучали в течение 4 ч УФ-лампой. Полученные полимерные мембраны отмывали в экстракторе Сокслета в смеси уксусной кислоты и метанола до полного удаления темплата (контроль отмывки спектрофотометрический), промывали мембрану  $1 \cdot 10^{-4}$  М раствором ЭДТА для удаления ионов металла, а затем водой и метанолом. Отмытый полимер сушили при 60°C в вакууме. Аналогичным способом синтезировали полимеры сравнения. Проницаемость мембраны изучали в диффузионной ячейке, состоящей из двух камер, заполненных смесью метанол-ТГФ (3:1 об.), в одну из камер добавляли изучаемый флавоноид (а в некоторых случаях – также соль металла). Диффузию проводили в течение 30 ч. Были изучены следующие мембраны: импринтированные кверцетином, комплексом кверцетина с цинком и мембрана, полимеризованная без темплата (кверцетина). Авторы добились довольно высоких факторов разделения: до 6.8 для пары кверцетин/нарингенин и до 9.5 для пары кверцетин/рутин. Однако при этом степень переноса кверцетина через мембрану составляла не более 2.3% за 30 ч диффузии.

К недостаткам методики [58] можно отнести, во-первых, длительность получения мембран, вызванную использованием малоэффективного инициатора – АИБН и необходимостью дегазации полимеризационной смеси для удаления кислорода перед полимеризацией (лишняя стадия); во-вторых, низкую степень переноса кверцетина в принимающую фазу и ограниченную селективность отделения кверцетина от других флавоноидов (рутина и нарингенина), вызванные использованием неоптимальных функциональных мономеров при получении мембраны и неоптимальных органических растворителей при проведении диффузионного выделения кверцетина. Эти недостатки мы стремились преодолеть в данной работе.

#### 1.1.4. Разработка методики полупрепаративного хроматофокусирования 8 – 10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием

В ионообменной хроматографии для полупрепаративного разделения смесей олигопептидов традиционно используют сильнокислотные катионообменные сорбенты (сульфокатиониты), чтобы исключить дополнительные неионные взаимодействия пептидов с функциональными группами и матрицей сорбента, характерные для слабокислотных карбоксильных катионообменников и приводящие к размыванию хроматографических зон и низкому разрешению пиков. Для элюирования наиболее сильно удерживаемых олигопептидов за приемлемое время применяют внешние ступенчатые градиенты с восходящим значением рН в широком интервале (от 3 до 7), либо создают градиент ионной силы [61 – 64]. Линейные внешние градиенты рН не удастся создать в таком широком диапазоне, а при формировании ступенчатого градиента на хроматограмме возникают т.н. "ложные" пики, вызванные резкой сменой параметров элюента на каждой следующей "ступени" градиента. Такие "ложные" пики создают дополнительные сложности при составлении пептидных карт белковых гидролизатов [61 – 69]. Поэтому весьма перспективной представляется применить технику хроматофокусирования для полупрепаративного разделения пептидов на сульфокатионитах в условиях внутреннего градиента рН.



Д.Фрей и соавторы предложили использовать технику хроматофокусирования для создания восходящего градиента рН, линейного в широком диапазоне (от 3 до 6 – 7), внутри сульфокатионообменных колонок [70, 71]. Как правило, в хроматофокусировании линейные градиенты рН создают внутри ионообменных колонок, обладающих значительной буферной емкостью [72, 73]. Считается, что формирование внутреннего градиента рН происходит за счет того, что ионообменный сорбент (предварительно приведенный в равновесие со стартовым буферным раствором) постепенно титруется полибуферным элюентом, и чем выше буферная емкость системы в целом, тем более плавный и линейный градиент рН формируется внутри колонки. Таким образом, в подавляющем большинстве случаев внутренние градиенты рН формируют в колонках со слабоосновными анионообменниками или слабокислотными карбоксильными катионообменниками. Сильнокислотные или сильноосновные ионообменные сорбенты практически не обладают буферной емкостью, и поэтому принято считать, что они не пригодны для использования в хроматофокусировании [72]. О формировании градиентов рН внутри сильнокислотных катионитов с использованием техники хроматофокусирования до недавнего времени сведений в литературе не было.

В статьях [70, 71, 74] внутренние линейные градиенты рН применили для разделения ди-, три- и олигопептидов, полученных трипсиновым гидролизом альбуминов различного происхождения. В качестве элюента, формирующего градиент рН внутри хроматографической колонки, использовали коммерческие полиамфолиты "Полибуфер-96" и "Полибуфер-74", обладающие высокой буферной емкостью, позволяющие сформировать на сильнокислотных катионитах градиенты, линейные в широком диапазоне рН. Вместе с тем авторы статей [71, 74] обнаружили, что детектирование большинства неароматических пептидов ниже 254 нм (особенно ближе к 200 нм) затруднено из-за собственного интенсивного поглощения "Полибуфера" в этой области спектра. Кроме того, требуется дальнейшая очистка собранных фракций пептидов от избытка "Полибуфера". Таким образом, актуален поиск простых элюентов, содержащих два-три активных (рН-определяющих) компонента, для замены полиамфолитов при хроматофокусировании пептидов на сульфокатионитах. Основываясь на

результатах, полученных нами ранее для карбоксильных сорбентов, можно предположить, что добавки инертного компонента (NaCl или другого сильного электролита) в простые подвижные фазы будут способствовать формированию градиентов pH, не уступающих полученным с помощью коммерческих полиамфолитов. Варьируя не только состав и природу активных компонентов, но и ионную силу подвижных фаз, можно получать градиенты pH различной формы. При правильном выборе ионной силы стартового раствора и элюента в слабых ионообменных системах удастся сформировать достаточно протяженные линейные или квазилинейные градиенты в интервале pH до 3 – 4 ед., а иногда и больше [75]. Наряду со снижением стоимости метода можно ожидать, что использование простых элюентов облегчит УФ-детектирование при длинах волн, близких к 200 нм, где поглощает пептидная связь. Таким образом, можно ожидать детектирования большинства пептидов, а не только ароматических.

Данный этап работы по госконтракту посвящен формированию восходящих градиентов pH простыми элюентами на сульфокатионите и применению полученных градиентов для разделения природных смесей пептидов.

1.1.5. Разработка способа установления влияния добавки гексафторида серы (0 – 40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок

Одним из перспективных направлений современной плазмохимии, позволяющих успешно решать важные задачи микро- и нанoeлектроники, является формирование тонких полимерных пленок на поверхности кремния в неравновесной химически активной плазме [76, 77]. Плазму высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана в его смеси с гексафторидом серы  $C_4F_8+SF_6$  при ионной бомбардировке поверхности используют для осаждения тонких фторуглеродных пленок (ФУП) на поверхности кремния [78, 79]. Этот процесс протекает в две стадии. На первой стадии пассивации, происходящей в плазме  $C_4F_8$ , осуществляется осаждение ФУП на дно и боковые стенки канавок травления. На второй стадии травления, которая происходит преимущественно в

плазме  $SF_6$ , осуществляется травление ФУП и кремния только со дна канавки. Травление боковой стенки при этом должно быть минимальным. В таком процессе стадия пассивации или осаждения ФУП является основной, поскольку осаждение необходимо провести таким образом, чтобы образование ФУП происходило преимущественно на стенке, а не на дне канавки. Потоки заряженных частиц на них различны, следовательно, разной будет скорость образования на стенке и дне канавок ФУП, поскольку скорость плазменной полимеризации зависит от плотности потока ионов и электронов [80]. Скорость образования ФУП зависит также от состава плазмы.

Плазменные процессы глубокого анизотропного травления кремния ( $> 100$  мкм), которые широко используются в технологии создания приборов микросистемной техники, осуществляются во фторсодержащей плазме ( $SF_6/C_4F_8$  или  $SF_6/O_2$ ) в циклическом режиме травление/пассивация [78, 79, 81, 82]. В процессе формирования структур на дне канавок или на открытой поверхности кремния образуются высокие конусообразные микроиглы, механизм возникновения которых изучен недостаточно. Возникновение микроигл в длительных процессах травления обычно связывали с осаждением и накоплением на поверхности кремния кластеров труднолетучих продуктов распыления металлических стенок реактора [83, 84]. Они являются микромаской для формирования игл. Однако микроиглы на поверхности кремния образуются, например, в плазме  $SF_6/O_2$  в определенных условиях сильной пассивации в коротких по времени процессах. Кроме микроигл на поверхности кремния при определенных условиях образуются столбчатые структуры [78, 79]. В обоих случаях в качестве микромаски выступают кластеры  $SiOF_x$ . Образование высоких микроигл (до 80 мкм) наблюдается также в циклическом процессе травление/пассивация в плазме  $SF_6/C_4F_8$ . Формирование микроигл меньших размеров (2 – 3 мкм) происходит в плазме  $CHF_3+O_2$  и  $CF_4$  при интенсивной ионной бомбардировке. Возникновение микроигл является негативным фактором при глубоком травлении кремния. Однако в последнее время такие структуры находят применение при создании покрытий с высоким коэффициентом оптического поглощения и элементов приборов микроэлектро-механических систем.

### 1.1.6. Выводы к обзору литературы

Рассмотрено современное состояние вопросов, связанных с разработкой химически модифицированных электродов для вольтамперометрического определения веществ, синтеза анионообменников для применения в ионной хроматографии, определением антиоксидантов в растительных экстрактах и пищевых продуктах, определением олигопептидов в растворах, а также с влиянием добавок гексафторида серы на процессы получения фторуглеродных пленок. Обсуждены области применения методов концентрирования и определения веществ, их основные недостатки. Показана актуальность и перспективность новых решений указанных вопросов.

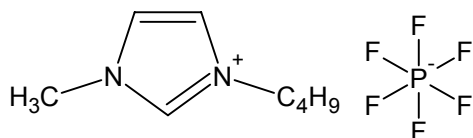
## 2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

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

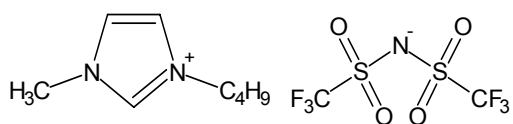
В рамках направления 5.1. календарного плана, как следует из обзора литературы, ионные жидкости – перспективные материалы для создания электрохимических сенсоров.

На наш взгляд, весьма интересна возможность использования гидрофобных ИЖ в составе модифицирующих композиций при разработке вольтамперометрических сенсоров. В соответствии с этим в рамках работы получали модифицированные печатные электроды для вольтамперометрического анализа.

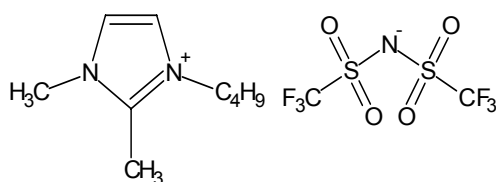
Использованные ионные жидкости показаны на рис. 3.



**BMImPF<sub>6</sub>** 1-Бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфат



**BMImTf<sub>2</sub>N** Бис-трифлилимид 1-бутил-2,3-метилимидазолия



**BDMImTf<sub>2</sub>N** Бис-трифлилимид 1-бутил-2,3-метилимидазолия

Рисунок 3 – Используемые в работе ионные жидкости.

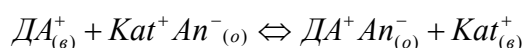
Предварительные исследования показали, что модифицированных электроды на основе ионных жидкостей пригодны для вольтамперометрического определения катехоламинов, гидроксикислот, некоторых аминокислот и замещенных фенолов.

Основное внимание в рамках работы было уделено разработке электродов для определения катехоламинов, являющихся практически важными объектами для биомедицинского и фармакологического анализа.

Катехоламины - производные аминокислоты тирозина - образуются в процессе декарбоксилирования и гидроксирования. Они содержатся в головном мозге животных и человека, являясь 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. Также следует отметить 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. Таким образом, ввиду широкого применения катехоламин-содержащих

препаратов и их низкой стабильности, контроль содержания в них катехоламинов играет важную роль.

Известно, что некоторые катехоламины необратимо окисляются в водных растворах на твердых электродах (золото, платина, углеродные материалы) с участием двух электронов. Есть данные об окислении катехоламинов в ионных жидкостях. Наши предварительные исследования показали возможность экстракции катехоламинов в ионные жидкости. Экстракция катехоламинов отличается высокой эффективностью и происходит по катионообменному механизму:



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

В рамках направления 5.2. календарного плана: одним из важнейших направлений развития современной ионной хроматографии (ИХ) является разработка новых сорбентов, обеспечивающих высокоэффективное и селективное определение неорганических анионов. Перспективно для синтеза ионообменников использовать матрицы на основе сополимера стирола и дивинилбензола (ПС-ДВБ) с высоким содержанием сшивающего агента, так как они не набухают в подвижных фазах, характеризуются высокой химической и механической стабильностью, а также, выдерживая высокие давления в системе, обеспечивают возможность снижения размера частиц (до 3 мкм) и, как следствие, повышение эффективности ионообменников. Однако при использовании анионообменников на основе ПС-ДВБ удерживание анионов может определяться не только ионообменными, но и неионообменными взаимодействиями, что негативно влияет на разделение, вызывая сильное удерживание поляризуемых анионов, таких как нитрат, бромид и нитрит, а также размывание их пиков, приводя к снижению эффективности. В связи с этим поиск новых вариантов синтеза анионообменников на основе ПС-ДВБ, характеризующихся меньшим влиянием матрицы на удерживание поляризуемых анионов и, как следствие, большей эффективностью, является актуальной научной задачей.

*Цель данного направления работы* состоит в получении лабораторного образца сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии, который должен обеспечивать разделение смеси фторида, хлорида, нитрита, нитрата, фосфата и сульфата менее, чем за 20 мин, с эффективностью не менее 20000 ТТ/м. Размер частиц сорбента должен находиться в пределах 3,5-5 мкм.

*Методы решения:*

Эффективность сорбента может быть повышена за счет:

- 1) использования в качестве основы полистирол-дивинилбензольной матрицы с малым диаметром частиц (3,5-5 мкм);
- 2) повышения гидрофильности функциональных групп, входящих в структуру сорбента за счет использования в качестве алкилирующих агентов соединений класса оксиранов.

Стабильность и хорошие эксплуатационные характеристики сорбента могут обеспечиваться за счет:

- 1) использования в качестве основы матрицы с высокой степенью сшивки, которая характеризуется повышенной химической и механической стабильностью;
- 2) ковалентным закреплением функциональных групп на поверхности матрицы.

В рамках направления 5.3. календарного плана: как показано в обзоре литературы, фотометрический метод удобен для определения антиоксидантов, в том числе биофлавоноидов, однако для обеспечения селективности определения отдельных соединений необходима стадия разделения (концентрирования). В данной работе более или менее селективное отделение аналита осуществляли диффузией его через мембрану, импринтированную этим аналитом. Определение проводили в принимающем растворе (пермеате) фотометрическим методом по обесцвечиванию окрашенных продуктов окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) – ароматического диамина, легко окисляющегося с образованием интенсивно окрашенного продукта. В качестве контрольных методов использовали спектрофотометрию (получали электронные спектры поглощения пермеатов), а также ВЭЖХ. В работе изучено два способа определения антиоксидантов: основанный на *предварительном* получении окрашенного продукта реакции

окисления ТМБ и последующем измерении антиоксидантной способности исследуемого объекта по уменьшению интенсивности поглощения этого окрашенного продукта («равновесный вариант») и на фотометрическом измерении скорости *образования* окрашенного продукта реакции окисления ТМБ, которая должна замедляться в присутствии веществ, обладающих антиоксидантной активностью («кинетический вариант»). Аналитические характеристики методик определения антиоксидантов сопоставили с характеристиками известного метода – обесцвечивания катион-радикала АБТС. Радикал-катион АБТС получали согласно опубликованной методике; максимальная концентрация радикала АБТС<sup>•+</sup> достигается спустя 6 ч после добавления окислителя. Концентрацию АБТС<sup>•+</sup> в рабочей смеси готовили такой, чтобы его оптическая плотность при 650 нм составляла около 0,7.

Для оценки антиоксидантной активности (АОА) соединений получали окрашенный продукт окислением ТМБ персульфатом или периодатом. Поглощение продуктов окисления ТМБ и АБТС измеряли при 650 нм, используя спектрофотометр СФ-102 и фотометр КФК-3. В качестве характеристики АОА использовали универсальный параметр ТЕАС, оценивая АОА в эквивалентах тролокса. За значение ТЕАС индивидуального соединения принимали концентрацию тролокса (ммоль/л), имеющую такую же АОА, как раствор исследуемого вещества с концентрацией 1 ммоль/л. Для объектов ТЕАС рассчитывали как концентрацию тролокса (ммоль/л), соответствующую по АОА концентрации изучаемого объекта 1 г/л.

В качестве подложек для получения импринтированных мембран использовали лавсановые трековые мембраны (ОИЯИ, Дубна) с диаметром пор 0.4 мкм, на которые наносили смесь, содержащую метакриловую кислоту (МАК) или акриламид (АА) в качестве функционального мономера, этиленгликоль-диметакрилат (ЭГДМА) в качестве сшивателя, тетрагидрофуран (ТГФ), бензиловый спирт, этилацетат или ацетон в качестве порогенного растворителя и фотоинициатор (Дарокур 1173 или фенилбис-(2,4,6-триметилбензоил)фосфиноксид), и, зажав мембрану между стеклами (при ограниченном доступе кислорода воздуха), облучали смесь светом кварцевой лампы. В смеси вводили также темплат (биофлавоноид). В ряде систем вводили



также сульфат меди(II) или ацетат никеля. Пленка получаемого полимера имела толщину около 10 мкм (при толщине подложки также 10 мкм). Мембрану отмывали от непрореагировавших компонентов, инициатора и темплата. Образование пленки полимера контролировали по скорости протекания воды через полученную мембрану под действием собственной тяжести и по массе высушенной мембраны.

Выделение аналита из смеси с помощью импринтированной мембраны проводили методом пассивной диффузии. Для этого использовали полипропиленовую ячейку, в которой два раствора – исходный и принимающий – разделены импринтированной мембраной. Объемы исходной и принимающей фаз составляли по 2 мл, эффективная площадь мембраны – 3.8 см<sup>2</sup>.

В рамках направления 5.4. календарного плана: в качестве образца выбрали трипсиновые гидролизаты человеческого (ЧСА, HSA) и бычьего сывороточного альбуминов (БСА, BSA). Для разделения природных смесей пептидов, полученных трипсиновым гидролизом альбумина, использовали стальную коммерческую колонку (200 x 4,6 мм) PRP-X200 (Hamilton, США), заполненную полимерным катионообменным сорбентом на основе полистиролдивинилбензола с привитыми сульфогруппами; размер частиц 10 мкм; pH-диапазон гидролитической устойчивости сорбента – от 1 до 13.

В качестве активных компонентов обеих подвижных фаз выбрали лимонную кислоту и Трис: лимонная кислота обеспечивает буферную емкость в области pH 3 - 6, а Трис – ближе к pH 7. Использовали также подвижные фазы, содержащие буферный раствор NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> в качестве активного компонента при pH 3 и 7. Ионную силу создавали добавлением рассчитанного количества NaCl.

*Методика получения трипсинового гидролизата альбуминов.* В качестве образца использовали человеческий сывороточный альбумин (ЧСА, HSA) или бычий сывороточный альбумин. Навеску образца растворяли в 50 мМ Трис-HCl при pH 8,5. Раствор трипсина (1 мг/мл) готовили растворением трипсина в 1 мМ HCl. Для получения гидролизата смешивали трипсин и субстратный белок (ЧСА или БСА) в массовом соотношении 1:25, образовавшуюся смесь оставляли на 24 ч при 37°C. Приготовленный таким образом трипсиновый гидролизат использовали в экспериментах в течение не более 2-3 суток (при хранении в холодильной камере).

*Методика эксперимента.* Хроматографическую колонку, заполненную сульфокатионитом PRP-X200, уравнивали стартовым раствором до pH 3,0 (до совпадения величин pH на входе и выходе колонки), а затем меняли стартовый раствор на элюент (pH 7,0) и регистрировали изменение кислотности и оптическую плотность (при 206 – 214 нм) эфлюента. При полупрепаративном разделении природных смесей пептидов вводили до 100 мкл раствора трипсинового гидролизата ЧСА или БСА (0,1 мг) и регистрировали сигнал УФ-детектора при 206 – 214 нм.

Задача исследования – разработать методику полупрепаративного хроматофокусирования 8 – 10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием, обеспечивающую разрешение хроматографических пиков не ниже 0,75-1,0.

В рамках направления 5.5. календарного плана: при формировании на поверхности кремния фторуглеродных пленок (ФУП) высокого качества необходимо контролировать скорость их осаждения, отношение концентраций F/C и соотношение фторуглеродных химических связей в ФУП. Для этого необходимо разработать способ установления влияния добавки гексафторида серы (0 – 40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения ФУП с точностью не хуже 0,1 нм/с, отношение концентраций F/C с точностью не хуже 0,1 % и соотношение химических связей C-F<sub>3</sub>, C-F<sub>2</sub>, C-F, C-CF<sub>n</sub>, C-C с точностью не хуже 1,0 %.

2.2. Разработка лабораторных образцов химически модифицированных электродов для вольтамперометрического определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот

Мы использовали гидрофобные ИЖ различной природы (BMImPF<sub>6</sub>, BMImTf<sub>2</sub>N и BDMImTf<sub>2</sub>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, проводить экстракционно-вольтамперометрический анализ, но имеют ряд достоинств по сравнению с классической процедурой. Это простота анализа

(работа с водными растворами); экспрессность (отсутствует отдельная стадия экстракции); используются малые количества ионных жидкостей ( $\approx 0,5$  мг ИЖ). Электроды отличаются миниатюрностью (10 x 28 мм), дешевизна и доступность.

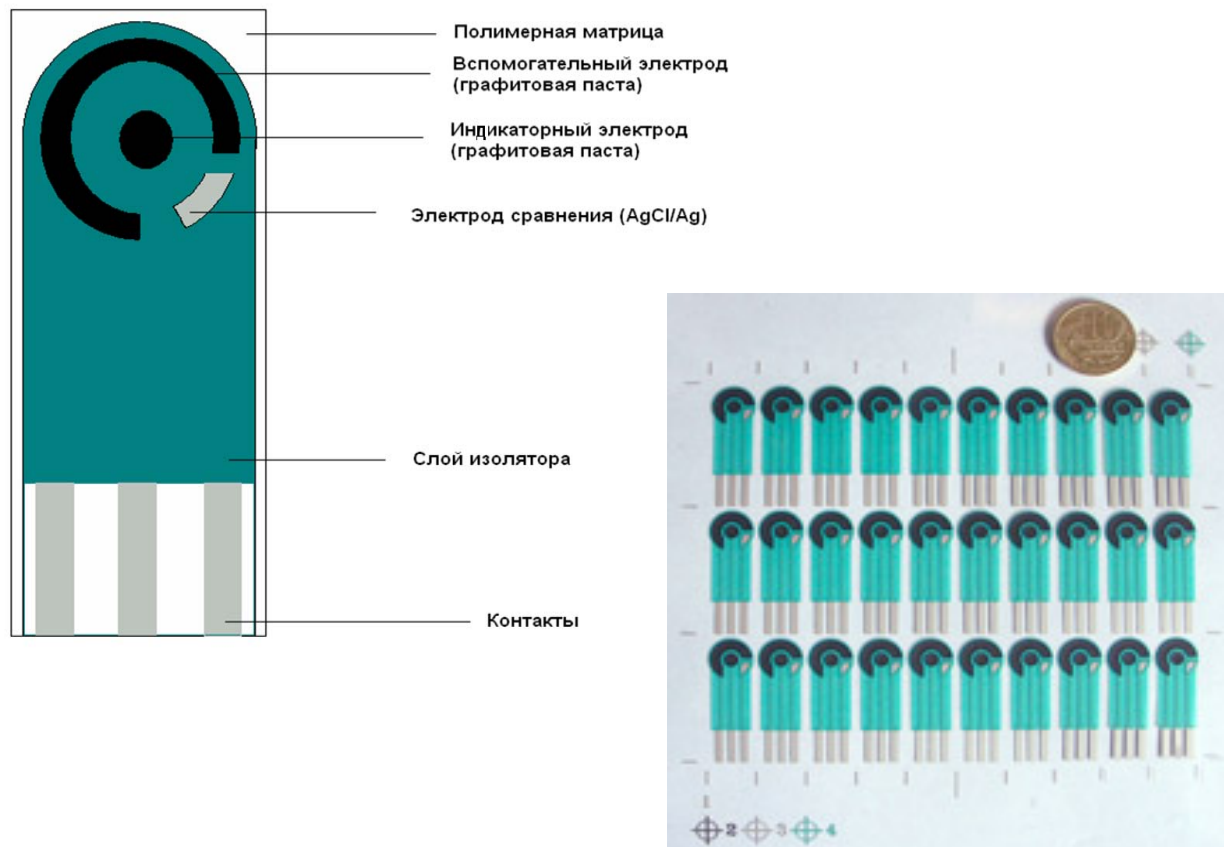


Рисунок 4 – Конструкция модифицированных печатных электродов.

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

Установлено, что окисление  $1,0 \cdot 10^{-3}$  М допамина на планарном электроде конструкции «3 в 1» при pH=2 (фон 0,01М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0,01М KCl; V=100 мВ/сек) происходит при потенциале 850 мВ, ток окисления составляет 7 мкА; при концентрациях допамина ниже  $1,0 \cdot 10^{-4}$ М на вольтамперограммах пик не наблюдается. Модифицирование поверхности индикаторного электрода тонким

слоем ИЖ обеспечивает увеличение тока окисления допамина в 7 раз, однако данный приём не является эффективным - ИЖ быстро смывается. Для получения модифицированного ИЖ электрода наиболее перспективно использовать графитовые пасты, в которых ИЖ может выступать одновременно в роли связующего и экстрагента (Рис. 3а).

Установлено, что окисление катехоламинов (адреналина, допамина, добутамина) на модифицированных электродах протекает необратимо, скоростьопределяющей стадией является диффузия деполяризатора.

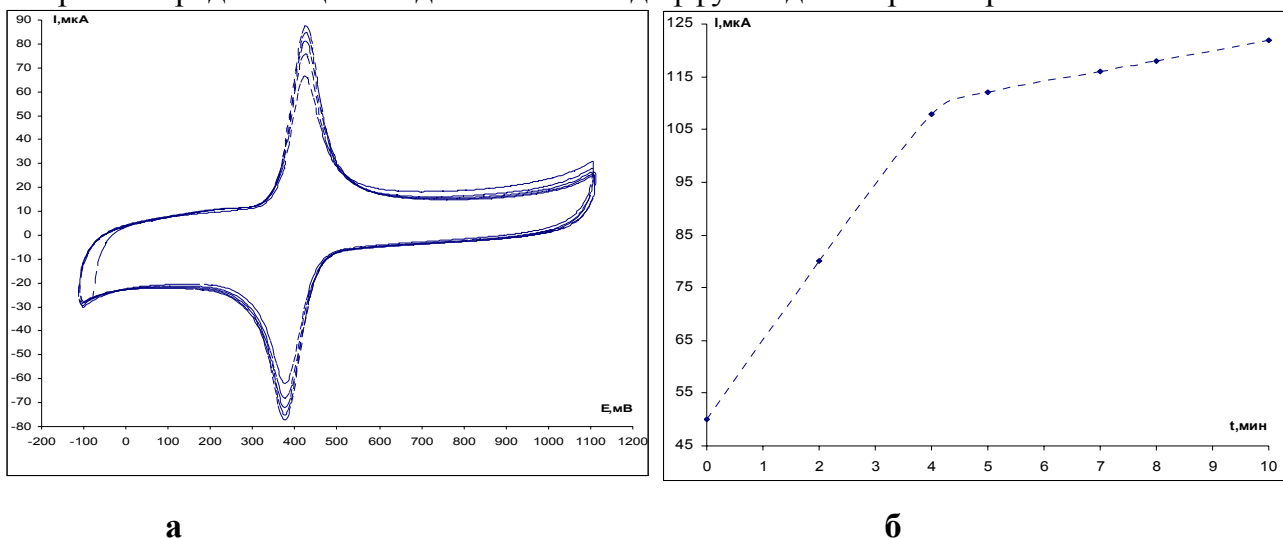


Рисунок 5 – Вольтамперограммы окисления  $1 \cdot 10^{-3}$  М допамина на планарном электроде, модифицированном пастой состава «графит:BDMI<sub>m</sub>Tf<sub>2</sub>N=2:3», 5-кратное сканирование потенциала (а); зависимость  $I_p$  окисления  $1 \cdot 10^{-3}$  М раствора допамина от времени накопления на том же электроде (б); фон 0,01 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0,01 М KCl; V=100 мВ/сек.

Обнаружено увеличение силы тока при выдерживании модифицированного электрода в растворе катехоламина при нулевом потенциале, что, очевидно, обусловлено накоплением деполяризатора в модифицирующем слое за счет экстракции катехоламинов в ионную жидкость.

На Рис.5б представлена зависимость силы тока окисления допамина от времени накопления. Установлено, что эффективность накопления существенно снижается уже через 4-5 минут после погружения электрода в анализируемый раствор, а после 10 минут накопления аналитический сигнал перестает увеличиваться. Таким образом, предварительное накопление в течение 4 – 5 минут

позволяет увеличить аналитический сигнал, что важно для определения низких концентраций катехоламинов.

Установлено, что использование механического перемешивания анализируемого раствора в процессе накопления катехоламинов приводит к значительному увеличению аналитического сигнала в результате ускорения процесса экстракции катехоламинов в ионную жидкость (рис. 6).

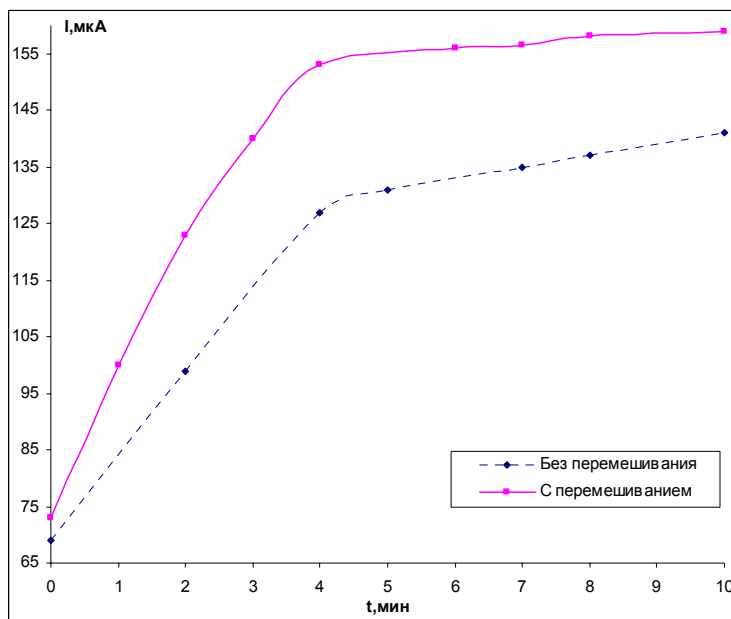


Рисунок 6 – Зависимость  $I_p$  окисления от времени накопления допамина  $1 \cdot 10^{-3}$  М на планарном электроде, модифицированном пастой состава «графит:BDMImTf<sub>2</sub>N =2:3» (фон 0,01М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0,01М KCl; V=100 мВ/сек

Как можно видеть, используя механическое перемешивание при накоплении можно достигать больших значений максимального тока за то же время (4-5 минут). Примечательно, что подобная закономерность характерна для всех ионных жидкостей.

Таким образом, использование предварительного накопления при нулевом потенциале с использованием механического перемешивания анализируемого раствора позволяет увеличить чувствительность определения и снизить предел обнаружения. Так, например, в случае использования планарного электрода, модифицированного композицией состава «графит:BMImPF<sub>6</sub>=2:3» накопление в течение нескольких минут при перемешивании позволило снизить предел обнаружения допамина в 3 раза.

Показано, что чем гидрофобнее катехоламин, тем лучше извлечение его в ИЖ и выше ток окисления; наилучшие результаты получены для добутамина.

Исследовали ИЖ различной природы -  $\text{VMImPF}_6$ ,  $\text{VMImTf}_2\text{N}$  и  $\text{BDMImTf}_2\text{N}$ . Изучено влияние природы используемой ИЖ на параметры работы электродов; установлена связь между гидрофобностью ИЖ, аналитическими характеристиками и эксплуатационным ресурсом сенсоров на их основе. Возможности использования наименее гидрофобной ИЖ  $\text{VMImPF}_6$  ограничены её растворимостью в воде – электроды, модифицированные пастой на основе  $\text{VMImPF}_6$ , хотя и характеризуются хорошей чувствительностью, обладают, однако, малым эксплуатационным ресурсом (несколько суток). В то же время введение метильного радикала в положение 2 имидазольного кольца, а также замена гексафторфосфатного аниона бис-трифлилимидным заметно понижает растворимость ИЖ в воде. Использование в качестве аниона  $\text{Tf}_2\text{N}$ - также снижает вязкость ИЖ, что позволяет ускорить процесс накопления аналита в слое модификатора. Наиболее эффективно использовать  $\text{BDMImTf}_2\text{N}$ .

Планарный электрод, модифицированный  $\text{BDMImTf}_2\text{N}$ , использован для определения адреналина в лекарственной форме «Ксилокаин адреналин»; методом «введено-найдено» показано отсутствие систематической погрешности определения. Миниатюрность конструкции модифицированных электродов позволяет работать с малыми объёмами анализируемых растворов (~50 мкл).

Одним из компонентов, сопутствующим катехоламинам в биологических объектах и в лекарственных препаратах, является аскорбиновая кислота. Окисление аскорбиновой кислоты протекает, как правило, при потенциале близком к потенциалам окисления катехоламинов либо при более низких потенциалах. Важной аналитической задачей является определение катехоламинов и аскорбиновой кислоты при совместном присутствии.

Так же, как и в случае окисления катехоламинов на электродах, модифицированных ионными жидкостями, электроокисление аскорбиновой кислоты является необратимым. Окисление аскорбиновой кислоты происходит при потенциалах, близких к потенциалам окисления катехоламинов. Пики окисления катехоламинов ( $E=400\text{-}500$  мВ) и аскорбиновой кислоты не разрешаются.

Для устранения влияния аскорбиновой кислоты при вольтамперометрическом определении катехоламинов с использованием планарных электродов, модифицированных ионными жидкостями, мы использовали Nafion. Этот полимер, имеющий ионную природу и обладающий ионной проводимостью, применяли для формирования модифицирующей пасты, позволяющей определять катехоламины в присутствии аскорбиновой кислоты. Кроме того, возможно, за счет электростатических взаимодействий между Nafion, графитом и ионной жидкостью подобная модифицирующая композиция будет лучше удерживаться на поверхности электрода.

Предварительно исследовали работу электродов, покрытых только Nafion без нанесения модифицирующей композиции, содержащей ИЖ. Установлено, что как и при модифицировании ионными жидкостями, происходит увеличение силы тока с течением времени нахождения в растворе катехоламинов при нулевом потенциале.

Очевидно, что аналогично ИЖ, Nafion, являясь катионообменником, может экстрагировать катехоламины. Время, за которое устанавливается равновесие на электроде, покрытом только слоем Nafion (5 мин), невелико; это, вероятно, объясняется малой толщиной модифицирующего покрытия. При использовании электрода, модифицированного только Nafion, чувствительность определения существенно ниже по сравнению с применением электрода, модифицированного ИЖ,  $C_{\text{мин}}$  выше  $10^{-5}$  М. Использование же Nafion в качестве связующего в сочетании с ИДЖ позволило улучшить способность паст удерживаться длительное время на поверхности электродов. Достигнуто и увеличение аналитического сигнала, что повышает чувствительность методики. Вероятно, это объясняется вкладом катионообменника Nafion в процесс экстракции и увеличением количества ионопроводящих компонентов.

Введение в состав модифицирующих паст добавки Nafion, который позволяет селективно пропускать определяемое вещество в виде катиона и электростатически отталкивать анионы, может использоваться для определения катехоламинов в присутствии аскорбиновой кислоты. При физиологических значениях  $\text{pH}=7,4$  аскорбиновая кислота ( $\text{pK}_a=4,1$ ) существует в анионной форме, тогда как катехоламины ( $\text{pK}_a=8,5-9,0$ ) в катионной. В результате аскорбат-ион

отталкивается от пленки Nafion на поверхности электрода. Действительно, на вольтамперограмме, полученной при использовании электрода, модифицированного пастой, содержащей Nafion, в растворе  $1 \cdot 10^{-4}$  М аскорбиновой кислоты с  $pH > 6$  пик окисления не наблюдается. Увеличение концентрации аскорбиновой кислоты приводит к появлению сигнала (Рис.63). При концентрации аскорбиновой кислоты выше порогового значения ( $2,0 \cdot 10^{-4}$  М), наблюдается пик при потенциале 548 мВ.

В фосфатном буферном растворе ( $pH=6,86$ ) были получены линейные зависимости тока окисления от содержания адреналина в исследуемом растворе, что позволяет использовать разработанный электрод для определения катехоламинов в присутствии аскорбиновой кислоты.

Таким образом, введение катионообменника Nafion в модифицирующую композицию улучшает эксплуатационные свойства электрода и позволяет определять катехоламины в присутствии 100-кратного избытка аскорбиновой кислоты (что важно при анализе биомедицинских и фармакологических объектов). В целом, пределы обнаружения катехоламинов находятся на уровне  $10^{-6}$  -  $10^{-8}$  М.

Для увеличения чувствительности модифицированных электродов мы исследовали возможность применения дополнительных реагентов, в частности, краун-эфиров и металлокомплексов.

Попытка использовать в качестве дополнительного реагента дибензо-18-краун-6 оказалась неудачной. Предполагалось, что хорошо известная способность ДБ18К6 связывать протонированные амины позволит увеличить степень извлечения катехоламинов в ИЖ. Однако величины  $I_p$  окисления уменьшаются по мере увеличения содержания ДБ18К6 в составе модифицирующей композиции, по сравнению с применением пасты на основе той же ионной жидкости без добавок. Вероятно, краун-эфир с одной стороны ухудшает электрохимические свойства пасты, снижая проводимость, а с другой - образует массивные комплексные соединения с катехоламинами, окисление которых, возможно, происходит с большим перенапряжением. Кроме того, коэффициент диффузии полученных комплексов существенно ниже, чем для катехоламинов, что снижает аналитический сигнал.



Удачным оказалось применение в качестве дополнительного реагента металлокомплекса, тетраакис-трет-бутилзамещенного фталоцианина Co(III) (PctCoI). Известно, что PctCoI является катализатором многих окислительных процессов, в том числе и окисления катехоламинов.

Было обнаружено значительное увеличение аналитического сигнала при окислении допамина на планарном электроде, модифицированном графитовой пастой на основе BDMImTf2N и содержащей небольшие количества PctCoI – так, максимум тока окисления изменился от 70 мкА до 160 мкА (рис. 7). Найдено, что увеличение содержания PctCoI в составе пасты также увеличивает аналитический сигнал.

Очевидно, введение PctCoI облегчает процесс электронного переноса и, как следствие, вызывает увеличение тока окисления.

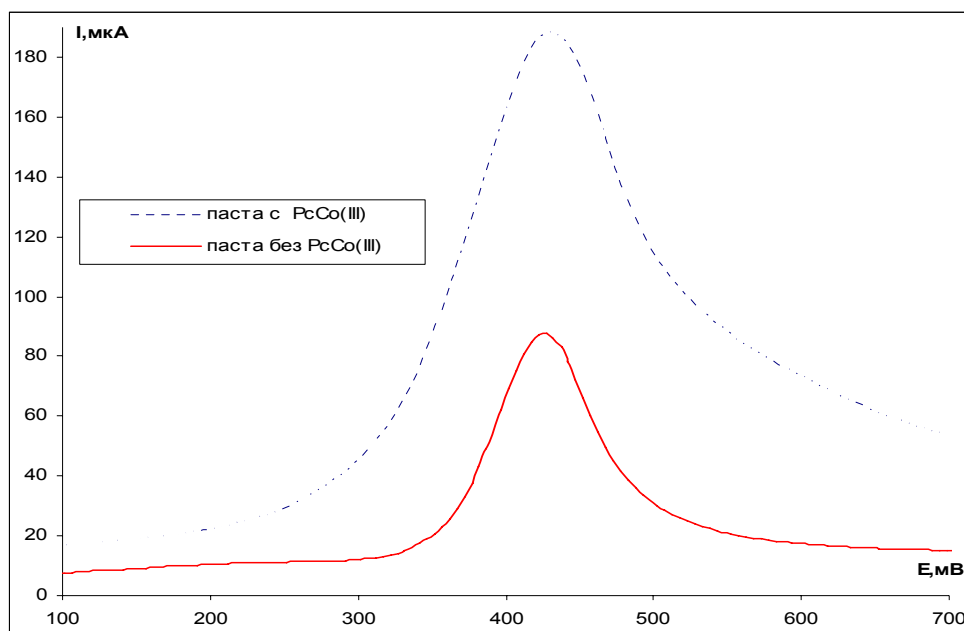


Рисунок 7 – Увеличение тока окисления  $1 \cdot 10^{-3}$  М допамина при введении в состав пасты 0,08% PctCoI (фон 0,01М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0,01М KCl; накопление 4 минуты; V=100 мВ/сек.).

Использование PctCoI позволяет увеличить чувствительность определения. На примере допамина показано, что при введении фталоцианата PctCoI (0,08 масс.%) оказывается возможно определять допамин в диапазоне концентраций  $1,3 \cdot 10^{-7}$ - $1,0 \cdot 10^{-4}$ М, причем предел обнаружения понизился примерно в 20 раз и составил  $(6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$ М (P=0,95; n=3).

Итоговые данные о метрологических характеристиках определения катехоламинов при помощи электродов, модифицированных исследованными композициями на основе ИЖ, приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Характеристики разработанных лабораторных образцов модифицированных электродов для вольтамперометрического анализа ( $P=0,95$ ;  $n=3$ ).

Электрод	Модификатор	Определяемое вещество	Диапазон линейности	Предел обнаружения $C_{min}$
1	Паста на основе BDMImTf <sub>2</sub> N+Naf ion	Адреналин	$2,9 \cdot 10^{-7}$ - $1,0 \cdot 10^{-4}$ М	$(1,31 \pm 0,06) \cdot 10^{-7}$ М
2	Паста на основе BDMImTf <sub>2</sub> N+Naf ion	Добутамин	$1,7 \cdot 10^{-7}$ - $1,0 \cdot 10^{-4}$ М	$(8,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$ М
3	Паста на основе BDMImTf <sub>2</sub> N+Naf ion	Допамин	$6,1 \cdot 10^{-7}$ - $1,0 \cdot 10^{-4}$ М	$(4,72 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$ М
4	Паста на основе BDMImTf <sub>2</sub> N+Naf ion и PctCoI	Допамин	$1,3 \cdot 10^{-7}$ - $1,0 \cdot 10^{-4}$ М	$(6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$ М

Таким образом, разработаны четыре лабораторных образца химически модифицированных электродов для вольтамперометрического анализа с пределами обнаружения ( $C_{min}$ ) не выше  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  М.

2.3. Разработка лабораторного образца сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии

*Выбор метода модифицирования матрицы.* Традиционным методом модифицирования является хлорметилирование матрицы. Однако синтез анионообменников, включающий ацилирование сополимера стирола и дивинилбензола, восстановительное аминирование по реакции Лейкарта и алкилирование, имеет существенное преимущество над хлорметилированием, так как он не требует работы с канцерогенными веществами. В литературе нет

примеров использования сорбентов, полученных таким способом, в хроматографическом анализе. Однако простота данного подхода для введения аминогрупп в полимерный каркас позволяет предположить его перспективность для синтеза анионообменников для ионной хроматографии (рис. 8).

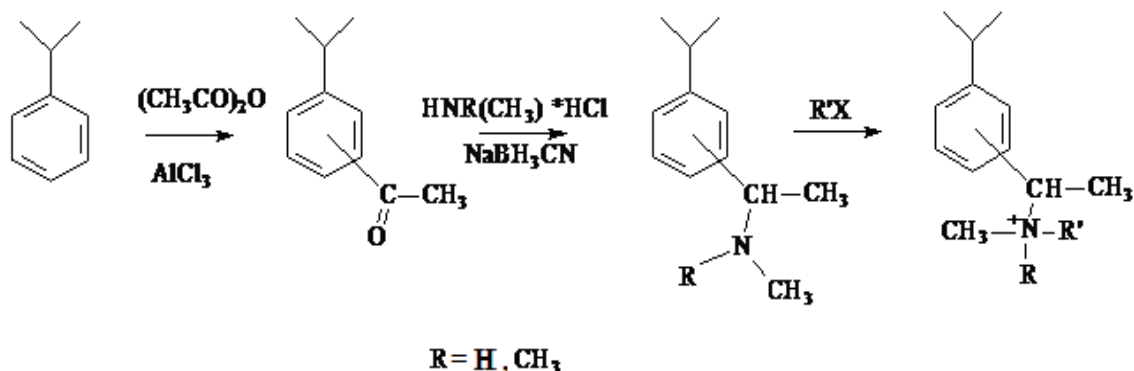


Рисунок 8 – Схема получения ацилированных анионообменников.

*Выбор функциональной группы.* Дополнительным достоинством выбранного метода модифицирования матрицы является возможность использования широкого круга реагентов на стадии алкилирования, что позволяет легко варьировать структуру функциональной группы и влиять тем самым на хроматографические свойства анионообменника.

Известно, что строение функциональной группы оказывает существенное влияние на хроматографические свойства анионообменников. Увеличение гидрофильности приводит к повышению эффективности сорбента, а длина алкильных радикалов у атома азота влияет на селективность разделения.

Традиционными алкилирующими агентами для аминогруппы являются галогеналканы и дигалогеналканы, однако при этом часто приходится сталкиваться с невысокой реакционной способностью и длительностью синтеза, а полученные таким образом анионообменники не всегда имеют емкость, удовлетворяющую требованиям ионной хроматографии с подавлением фоновой электропроводности.

Перспективными алкилирующими агентами являются соединения класса оксиранов, которые обладают высокой реакционной способностью в реакциях раскрытия трехчленного цикла под действием различных нуклеофильных агентов, таких как вода, спирты и амины, что позволяет существенно сократить время синтеза анионообменников. В результате раскрытия оксиранового цикла третичными аминами образуется четвертичная аммониевая соль, в которой один из

радикалов на атоме азота содержит гидроксильную группу. Это позволяет предположить перспективность использования соединений класса оксиранов для модифицирования третичных аминогрупп с целью получения более гидрофильных четвертичных аммониевых групп и повышения эффективности сорбента. Кроме того, за счет выбора оксирана необходимого строения можно модифицировать аминогруппу радикалами различной длины, влияя тем самым и на селективность разделения.

В данной работе наряду с алкилированием аминогруппы галоген- и дигалоген-алканами впервые предложено использование соединений класса оксиранов для модифицирования функциональных групп и повышения их гидрофильности (рис. 9). Емкости синтезированных анионообменников представлены в табл. 2.

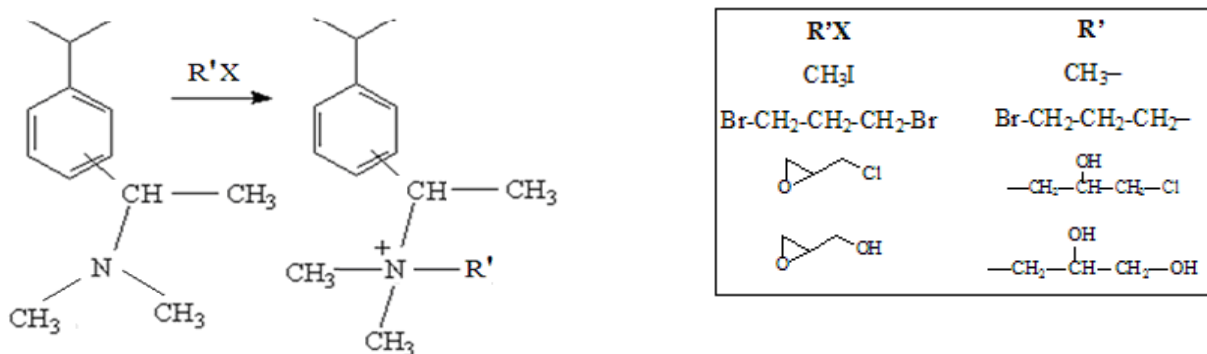


Рисунок 9 – Схема синтеза анионообменников, ацилированных уксусным ангидридом.

Таблица 2 – Обозначение сорбентов и емкость\* синтезированных ацилированных анионообменников.

Обозначение сорбента	Алкилирующий агент	Функциональная группа	Емкость, ммоль/г
ТМА	иодометан	$-N^+(CH_3)_3$	0,052±0,005
ДБП	1,3-дибромпропан		0,044±0,004
ЭХГ	эпихлоргидрин		0,065±0,006
ГЛ	глицидол		0,077±0,007

\*n=3, P=0,95

*Изучение хроматографических свойств. Хроматографические свойства сорбента с негидрофильной триметиламмониевой группой (ТМА). При*

использовании буферного раствора или раствора гидрокарбоната натрия в качестве элюентов на анионообменнике ТМА с негидрофильной триметиламмониевой группой наблюдается anomальное удерживание поляризуемых нитрат- и бромид-ионов, а также низкие значения эффективностей для этих анионов (табл. 3, рис. 10). Это связано с наличием сильных неионообменных взаимодействий этих анионов с матрицей.

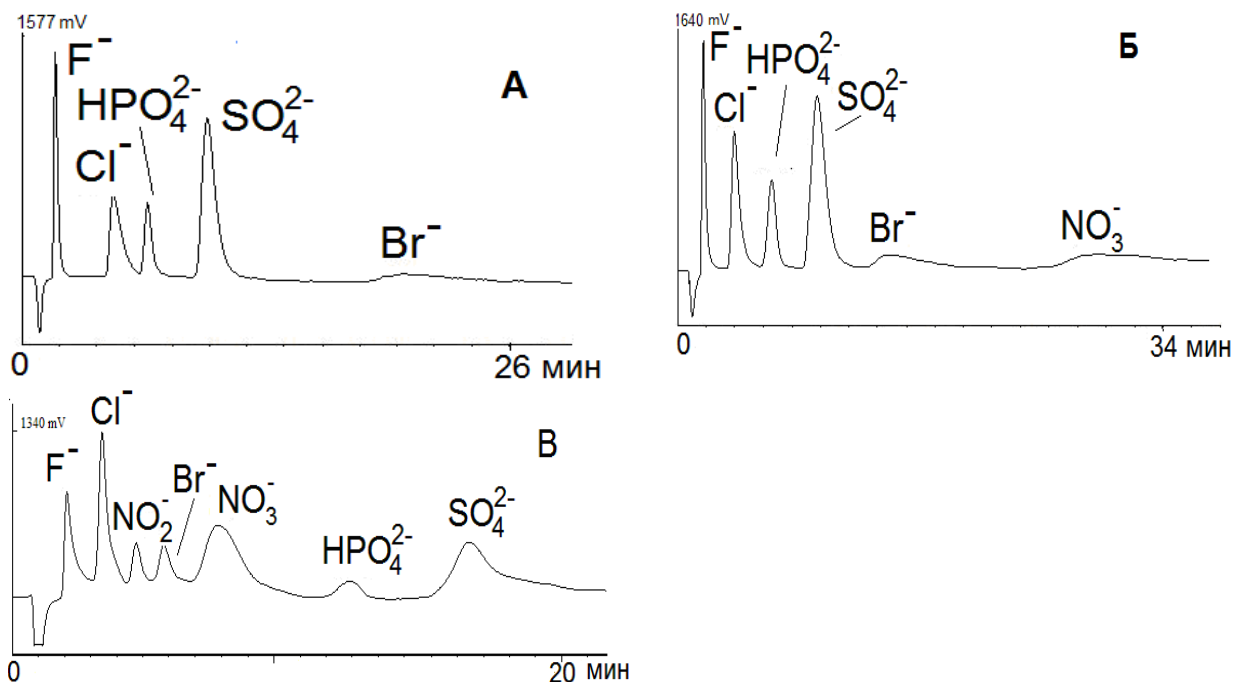


Рисунок 10 – Хроматограммы смесей неорганических анионов на сорбенте ТМА.

Элюент: А - 1,8 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO<sub>3</sub>, Б - 15 мМ NaHCO<sub>3</sub>, В - 8 мМ NaHCO<sub>3</sub> + 0,1 мМ NaClO<sub>4</sub>, F=1,0 мл/мин.

Таблица 3 – Факторы удерживания анионов и эффективность анионообменника ТМА.

Определяемый анион	Элюент 1,8 мМ Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO <sub>3</sub>		Элюент 15 мМ NaHCO <sub>3</sub>		Элюент 8 мМ NaHCO <sub>3</sub> + 0,1 мМ NaClO <sub>4</sub>	
	k'	N, тт/м	k'	N, тт/м	k'	N, тт/м
F <sup>-</sup>	1,79	7300	1,8	4500	2,07	3700
Cl <sup>-</sup>	4,96	5800	4,04	4600	3,42	9700
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	9,72	4500	8,99	3400	4,71	20700
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6,82	28000	6,79	11700	12,87	27400
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	10,08	16800	10,12	6700	17,42	20800
Br <sup>-</sup>	20,84	4300	14,65	3600	5,77	10000
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	44,12	2400	27,96	1800	7,82	3600

*Хроматографические свойства сорбентов с удлинённым алкильным радикалом при атоме азота.* Сорбенты ДБП, ЭХГ и ГЛ по сравнению с сорбентом ТМА содержат удлинённый алкильный радикал при атоме азота. Оказалось, что при увеличении длины алкильного радикала наблюдается уменьшение сродства ионов к ионообменнику, по-видимому, из-за стерических затруднений при их взаимодействии с четвертичным атомом азота. Это приводит к существенно более низким значениям коэффициентов емкости сорбента ДБП (табл. 4) по сравнению с анионообменником ТМА (табл. 3), уменьшению селективности разделения и, как следствие, к снижению разделяющей способности сорбента ДБП. Кроме того, эффективность данного анионообменника оказалась довольно низкой, в особенности, по поляризуемым ионам, что говорит о наличии неионообменных взаимодействий этих анионов с матрицей. Таким образом, использование дигалогеналканов для модифицирования третичных аминогрупп не является перспективным для предложенного метода синтеза.

*Хроматографические свойства сорбентов с удлинённым гидрофильным радикалом при атоме азота.* Наилучшими эффективностью и разделяющей способностью среди полученных анионообменников при использовании карбонатных буферных растворов и растворов гидрокарбоната натрия характеризуются сорбенты, полученные при алкилировании аминогруппы соединениями класса оксиранов – ЭХГ и ГЛ (табл. 4, табл. 5). Хроматограммы, полученные на этих сорбентах, представлены на рис. 11.

Таблица 4 – Хроматографические параметры сорбентов с удлинённым радикалом при использовании элюента 1,8 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO<sub>3</sub>.

Определяемый анион	ДБП		ЭХГ		ГЛ	
	k'	N, тт/м	k'	N, тт/м	k'	N, тт/м
F <sup>-</sup>	1,34	6700	0,67	9500	2,39	8800
Cl <sup>-</sup>	2,48	7700	1,73	13000	5,18	11000
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3,41	2700	3,57	10000	8,72	9000
Br <sup>-</sup>	5,34	2900	4,78	9000	7,53	8500
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,83	1100	7,71	8000	9,20	7700
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3,41	17700	4,81	50000	13,7	42000
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3,94	8700	5,52	30000	22,8	35000

Таблица 5 – Характеристики сорбентов ДБП, ЭХГ и ГЛ при использовании гидрокарбонатных элюентов.

Определяемый анион	ДБП/6 мМ NaHCO <sub>3</sub>		ЭХГ/5 мМ NaHCO <sub>3</sub>		ГЛ/8 мМ NaHCO <sub>3</sub>	
	k'	N, тт/м	k'	N, тт/м	k'	N, тт/м
F <sup>-</sup>	2,05	6700	1,21	12000	1,09	8400
Cl <sup>-</sup>	3,43	7600	2,86	17000	3,54	14000
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5,18	3700	4,93	15000	7,11	8400
Br <sup>-</sup>	9,58	4300	7,07	10000	11,61	7400
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	12,4	2100	11,72	8500	15,43	5500
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	8,36	16200	15,86	35000	17,57	32000
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12,8	15600	21,73	25000	24,65	31000

Следует отметить, что при элюировании растворами гидрокарбоната ряд удерживания анионов на обоих гидрофильных анионообменниках соответствовал традиционному для ионной хроматографии и аномального удерживания поляризуемых анионов не наблюдалось, а форма пиков всех анионов была существенно лучше, чем в случае негидрофильного сорбента ДБП. Максимальные эффективности для сорбентов с гидрофильными группами – 50000 (сорбент ЭХГ) и 42000 (сорбент ГЛ) тт/м для фосфат-иона, тогда как в случае сорбента ДБП это значение составило лишь 17700 тт/м. Следует отметить, что на гидрофильных сорбентах получены очень высокие значения эффективностей для поляризуемых анионов – 10000 и 8500 тт/м для бромида и нитрата соответственно и 15000 тт/м для слабополяризуемого нитрита. При этом на обоих анионообменниках наблюдается меньшее размывание пиков этих анионов по сравнению с сорбентами ТМА и ДБП, что подтверждается данными табл. 6 и говорит о снижении влияния матрицы на удерживание поляризуемых анионов при повышении гидрофильности функциональной группы.

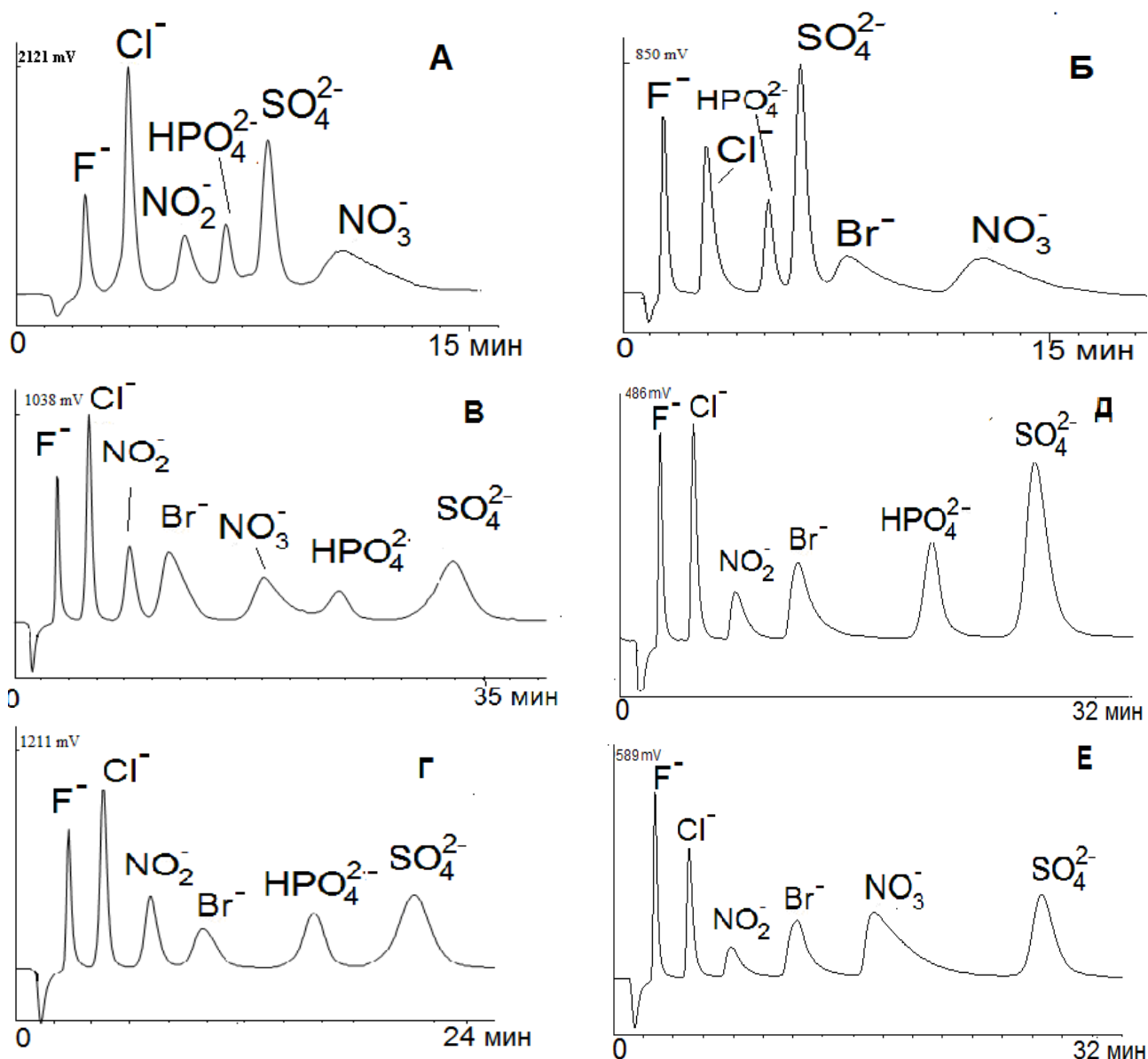


Рисунок 11 – Хроматограммы смесей неорганических анионов. Сорбент ЭХГ: А - элюент 1,8 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO<sub>3</sub>; В - элюент 5 мМ NaHCO<sub>3</sub>; Г - элюент 7 мМ NaHCO<sub>3</sub>, F=0,8 мл/мин. Сорбент ГЛ: Б - элюент 1,8 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO<sub>3</sub>; Д, Е – элюент 8 мМ NaHCO<sub>3</sub>, F=1,0 мл/мин.

*Изучение свойств анионообменника с повышенной гидрофильностью.* Как было показано выше, введение гидрофильного радикала в функциональную группу в процессе алкилирования приводит к существенному снижению влияния матрицы на удерживание поляризуемых анионов. И подход к синтезу, заключающийся в модифицировании аминогруппы соединениями класса оксиранов, оказался перспективным для повышения гидрофильности функциональной группы и эффективности сорбентов. В данной работе предложен способ дальнейшего



повышения гидрофильности за счет введения двух радикалов, образующихся при раскрытии оксиранового цикла, для минимизации негативного влияния матрицы и получения *анионообменника с повышенной гидрофильностью* (МА-ЭХГ). Схема синтеза представлена на рис.12.

Таблица 6 – Коэффициенты асимметрии ( $A_s$ ) пиков некоторых поляризуемых и неполяризуемых анионов на ацилированных анионообменниках.

Определяемый анион	ТМА/15 мМ NaHCO <sub>3</sub>	ДБП/6 мМ NaHCO <sub>3</sub>	ЭХГ/5 мМ NaHCO <sub>3</sub>	МА-ЭХГ (В)/24 мМ NaHCO <sub>3</sub> (см. п.3.5)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3,2	3,3	1,9	1,6
Br <sup>-</sup>	3,5	2,8	2,3	1,3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3,9	4,4	2,4	1,8
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,4	1,1	1,1	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,8	1,5	0,92	1,1

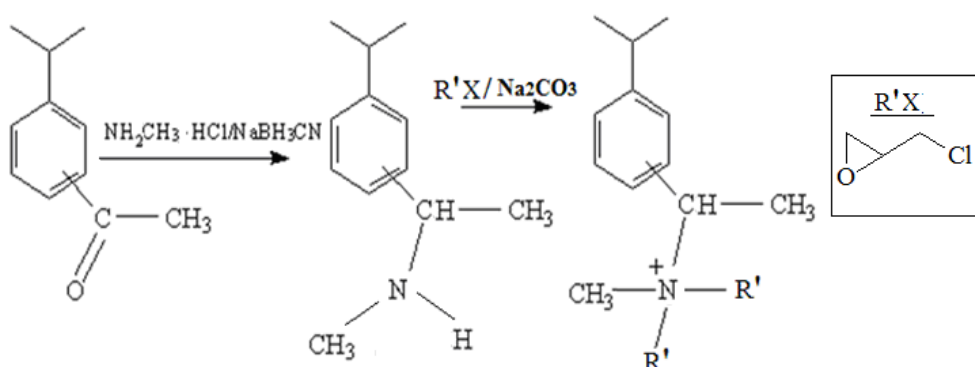


Рисунок 12 – Схема синтеза анионообменника МА-ЭХГ с повышенной гидрофильностью.

Из-за стерических препятствий при введении двух удлиненных гидрофильных радикалов синтез проводили в более жестких условиях, чем синтез сорбента ЭХГ. Емкость полученного сорбента МА-ЭХГ составила 0,098 ммоль/г. На рис.8 представлены хроматограммы, полученный на сорбенте МА-ЭХГ при использовании различных подвижных фаз. Следует отметить, что форма пиков поляризуемых бромид- и нитрат-ионов на сорбенте МА-ЭХГ лучше, чем на

сорбенте ЭХГ, что, вероятно, связано со снижением влияния матрицы при введении дополнительного гидрофильного радикала. Исходя из высоких значения эффективностей для поляризуемых анионов (табл. 7), снижения их относительного удерживания и улучшения формы пиков, можно сделать вывод, что неионообменные взаимодействия с матрицей вносят незначительный вклад в удерживание этих анионов.

Таблица 7 – Эффективности анионообменника МА-ЭХГ с повышенной гидрофильностью при использовании различных элюентов, тт/м.

Анион	1,8 мМ Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO <sub>3</sub>	4 мМ Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 4 мМ NaHCO <sub>3</sub>	24 мМ NaHCO <sub>3</sub>	12 мМ NaHCO <sub>3</sub>	8 мМ Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
F <sup>-</sup>	3200	2600	4000	3800	2000
HCOO <sup>-</sup>	4000	4800	11800	8800	3400
Cl <sup>-</sup>	7200	5600	9600	8800	6000
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6800	10000	12600	9000	14100
Br <sup>-</sup>	2200	7200	12000	11000	5800
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2000	5000	8000	7400	4600
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	28000	19000	29000	35000	23000
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	16000	16500	25000	29000	19500

Таким образом, по сравнению с сорбентом ЭХГ сорбент МА-ЭХГ имеет лучшую разделяющую способность и при использовании элюента 24 мМ NaHCO<sub>3</sub> позволяет поводить разделение 7 анионов за 10 минут, а при использовании 12 мМ NaHCO<sub>3</sub> – 8 анионов менее чем за 25 минут. Еще одним преимуществом анионообменника с повышенной гидрофильностью (МА-ЭХГ) над сорбентом с одним гидрофильным радикалом в функциональной группе (ЭХГ) является возможность использования большого разнообразия подвижных фаз, что в зависимости от поставленной задачи позволяет выбрать наиболее подходящие условия для проведения экспрессного анализа.

*Практическое применение полученных анионообменников.* Анализ реальных объектов проводили на анионообменниках, обладающих наилучшими хроматографическими свойствами – ЭХГ и МА-ЭХГ.

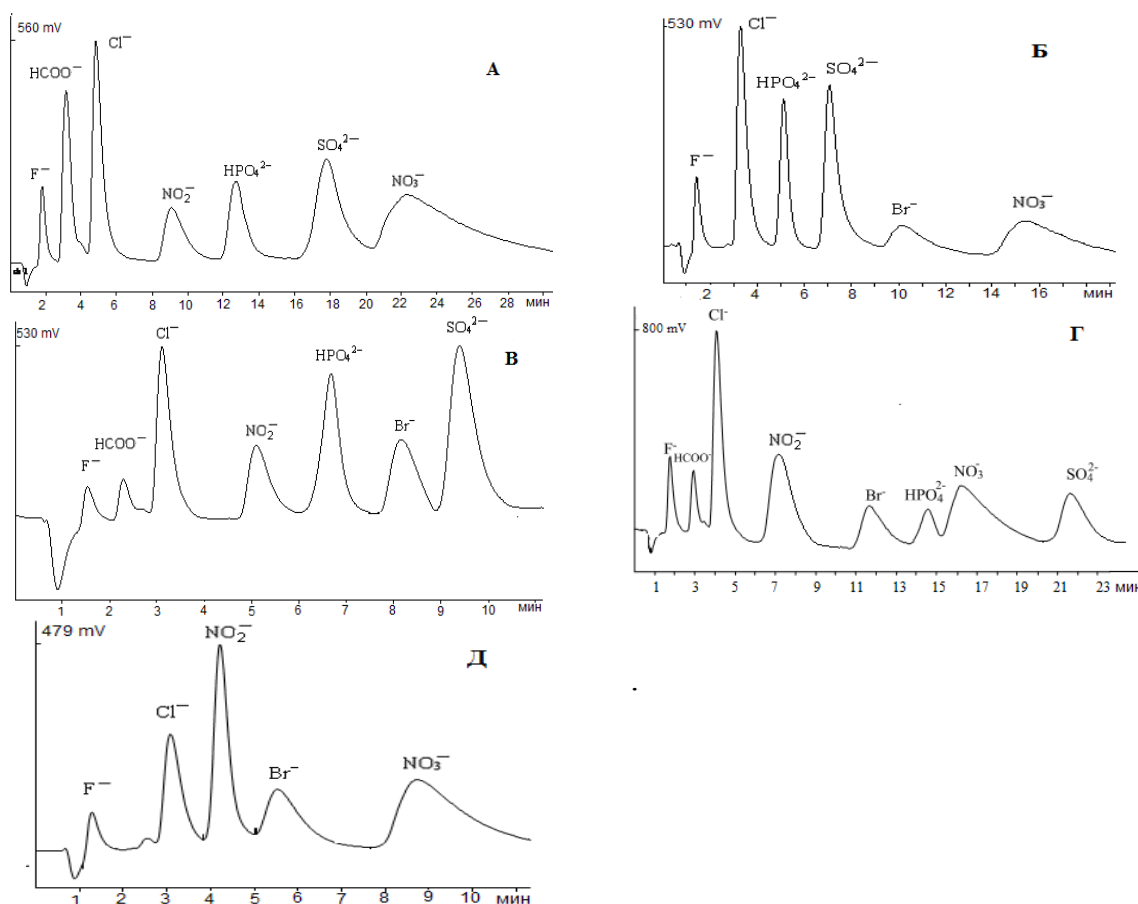


Рисунок 13 – Хроматограммы смесей неорганических анионов на сорбенте МА-ЭХГ с повышенной гидрофильностью. Элюенты: А - 1,8 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ +1,7 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , Б - 4 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 4 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , В - 24 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , Г - 12 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , Д - 8 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

*Анализ вод.* Проведен анализ образца водопроводной воды из города Жуковский и воды из скважины. Анализ проводили на колонке размером 50×4 мм, заполненной анионообменником ЭХГ, с использованием гидрокарбонатного элюента (рис. 14). Полученные результаты представлены в табл. 8.

*Определение неорганических анионов в зубной пасте.* На анионообменниках с повышенной гидрофильностью определяли содержание анионов в образцах зубной пасты «Aquafresh» и «Lacalut alpin». Пробоподготовку осуществляли согласно методике, предложенной компанией Dionex для определения анионов в зубной пасте. Хроматограммы представлены на рис. 15, а результаты анализа – в табл. 9.

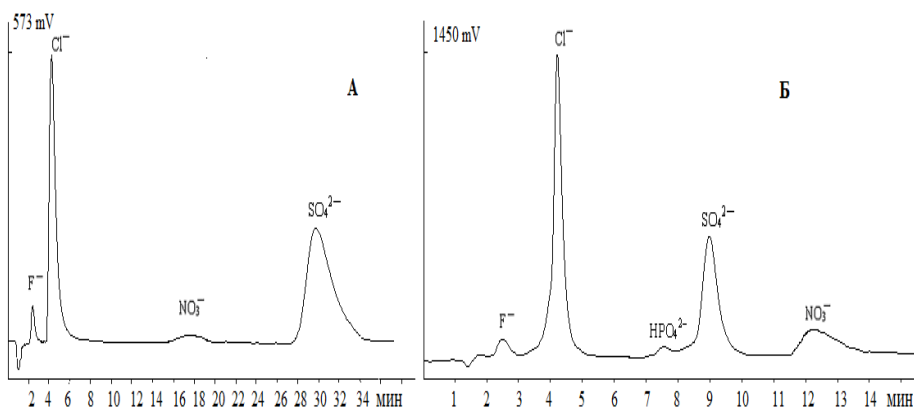


Рисунок 14 – Хроматограммы водопроводной воды (А) и воды из скважины (Б) на сорбенте ЭХГ. Элюенты: А – 5 мМ NaHCO<sub>3</sub>. Б - – 1,8 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO<sub>3</sub>. F=0,8 мл/мин.

Таблица 8 – Результаты определения анионов в воде (n=3, P=0,95).

Анион	Предел обнаружения		Водопроводная		Предел обнаружения		Скважина	
	C <sub>min</sub> , мкг/л	m, нг	C, мг/л	S <sub>r</sub>	C <sub>min</sub> , мкг/л	m, нг	C, мг/л	S <sub>r</sub>
F <sup>-</sup>	2	0,1	0,65±0,04	0,02	2	0,1	0,19±0,01	0,03
Cl <sup>-</sup>	4	0,2	50±3	0,02	3	0,15	2,5±0,2	0,03
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	40	2	4,1±0,5	0,05	50	2,5	8±1	0,05
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	40	2	–	–	30	1,5	0,69±0,07	0,04
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20	1	150±10	0,03	20	1	3,8±0,4	0,04

Таблица 9 – Результаты определения анионов в зубных пастах (n=3, P=0,95).

Анион	Предел обнаружения		Lacalut alpin		Aquafresh	
	C <sub>min</sub> , мкг/л	m, нг	C, г/кг	S <sub>r</sub>	C, г/кг	S <sub>r</sub>
F <sup>-</sup>	3	0,15	1,4±0,2	0,06	1,4±0,2	0,05
Cl <sup>-</sup>	5	0,25	6,4±0,8	0,05	0,08±0,01	0,05
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20	1	0,13±0,02	0,07	0,39±0,07	0,07

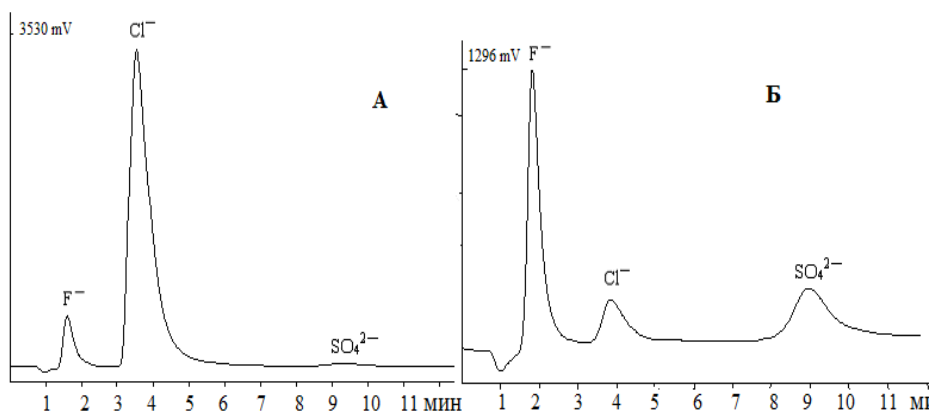


Рисунок 15 – Хроматограммы образцов зубной пасты на сорбенте МА-ЭХГ. А – «Lacalut alpin», Б – «Aquafresh». Элюент: 4 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 4 мМ NaHCO<sub>3</sub>. F=1,0 мл/мин.

*Анализ водной вытяжки из почвы.* На сорбенте с повышенной гидрофильностью МА-ЭХГ определяли содержание неорганических анионов в водной вытяжке из почвы (рис. 16). Результаты представлены в табл. 10.

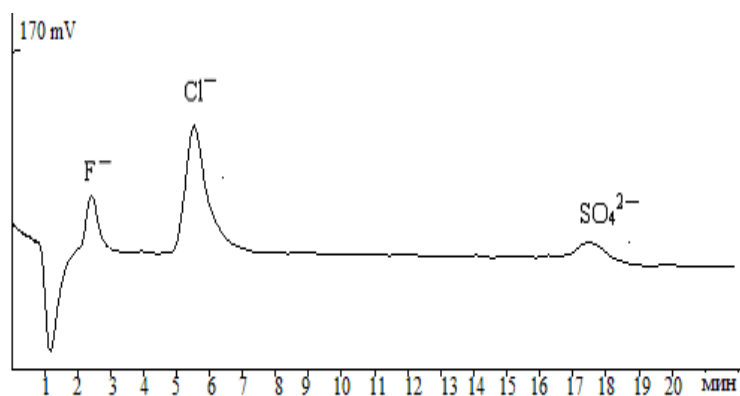


Рисунок 16 – Хроматограмма водной вытяжки из почвы на сорбенте МА-ЭХГ. Элюент: 1,8 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO<sub>3</sub>. F=1,0 мл/мин.

Таким образом, показано, что новые анионообменники с повышенной гидрофильностью могут использоваться для определения анионов в разных объектах. Результаты определения анионов характеризуются правильностью и воспроизводимостью, характерной для ионной хроматографии при использовании коммерческих колонок.

Таблица 10 – Результаты определения анионов в почвенной вытяжке (n=3, P=0,95).

Анион	Предел обнаружения		Оценка воспроизводимости		Оценка правильности		
	$C_{min}$ , мкг/л	m, нг	C, мг/л	$s_r$	Введено, мг/л	Найдено, мг/л	$s_r$
F <sup>-</sup>	2	0,1	0,35±0,04	0,04	0,2	0,51±0,05	0,04
Cl <sup>-</sup>	6	0,3	1,7±0,2	0,03	1,0	2,9±0,2	0,03
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	20	1	–	–	1,5	1,4±0,2	0,04
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	40	2	–	–	3	2,7±0,3	0,05
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	30	1,5	–	–	1,5	1,5±0,2	0,03
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20	1	1,0±0,1	0,05	0,5	1,4±0,2	0,04

Таким образом, разработан лабораторный образец сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии, обеспечивающий разделение смеси фторида, хлорида, нитрита, нитрата, фосфата и сульфата менее, чем за 20 мин, с эффективностью не менее 20000 ТТ/м. Размер частиц сорбента находится в пределах 3,5-5 мкм.

2.4. Разработка методики селективного определения отдельных групп антиоксидантов (например, биофлавоноидов) в растительных экстрактах и пищевых продуктах

*Получение мембран, импринтированных биофлавоноидами.* При изучении селективности импринтированных биофлавоноидами трековых мембран выяснилось, что полимеризованные в присутствии меди(II) мембраны более селективны, чем полученные без металла. При этом введение меди в раствор, из которого извлекают биофлавоноид, понижает селективность его извлечения. Это означает, что механизм действия иона переходного металла более сложен, чем предполагалось в литературе [85, 86]: видимо, разнолигандные комплексы металла с мономером и темплатом не образуются, а имеет место в основном комплексообразование металла с темплатом (образующим более устойчивый комплекс, чем карбоксильные группы полимера). При этом взаимодействие между мономером (полимером) и темплатом при импринтинге происходит не за счет образования водородных связей, а за счет гидрофобных взаимодействий.

Для полученных мембран изучили сорбцию биофлавоноидов и диффузионную проницаемость по отношению у них в зависимости от состава полимеризационной смеси и состава исходной и принимающей фаз, в том числе pH и содержания органического растворителя. Для импринтинга кверцетина оптимальна система МАК – ЭГДМА – Дарокур 1173 – ТГФ, причем диффузию через полученную мембрану следует проводить из ацетатного буфера (pH 5.4) в смесь метанол–уксусная кислота (9:1), а для нарингенина – система акриламид – ТЭГДМА – ДМФА и фосфиноксидный фотоинициатор, а диффузию следует осуществлять из ацетатного буфера (pH 7.2). Максимальные факторы разделения при мембранной диффузии составили: нарингенин/рутин – 4–14, кверцетин/рутин – 4, кверцетин/нарингенин – 12.

*Разработка методик определения антиоксидантов после мембранного концентрирования.* В качестве аналитов использовали растворы индивидуальных биофлавоноидов, а антиоксидантов других классов, аскорбиновой, галловой и мочевиной кислот. В качестве объектов использовали водные и водно-этанольные экстракты растительного сырья: черного и зеленого чая, ромашки и бессмертника, а также биологические жидкости (мочу). Определение проводили в кинетическом, равновесном и тест-вариантах. В дальнейшем для повышения селективности определения индивидуальных биофлавоноидов перед проведением индикаторной реакции концентрировали аналит методом диффузии через импринтированную им мембрану.

*Определение антиоксидантной активности в кинетическом варианте.* Кинетический вариант оценки АОА реализовали на примере реакции окисления ТМБ периодатом – реакции, скорость которой удобна для измерения. Для этого непосредственно в кювете смешивали 200 мкл  $1 \cdot 10^{-2}$  М раствора ТМБ, 100 мкл анализируемого раствора и 100 мкл  $2 \cdot 10^{-3}$  М раствора периодата натрия. Доводили объем смеси водой до 2,0 мл, помещали кювету в спектрофотометр и измеряли светопоглощение синего продукта каждые 10 с при 650 нм. Для построения линейной зависимости скорости реакции от концентрации антиоксиданта использовали площади под кинетическими кривыми за 5 мин, которые рассчитывали при помощи программы GraphPad Prism 5 [87]. Полученные данные далее использовали для расчета параметра ТЕАС анализируемых объектов.

*Определение антиоксидантной активности в равновесном варианте.* В качестве реагента, восстанавливаемого антиоксидантами, использовали продукт одноэлектронного окисления ТМБ персульфатом, имеющий синюю окраску. Окрашенный продукт окисления ТМБ образуется почти полностью через 2 мин (максимальный выход – через 5 мин), причем раствор его стабилен в широком диапазоне рН (2–8) и может храниться в темноте в течение нескольких дней. Для приготовления продукта окисления ТМБ смешивали по 200 мкл  $1 \cdot 10^{-2}$  М ТМБ в этаноле, 100 мкл  $1 \cdot 10^{-3}$  М персульфата в воде и разбавляли смесь до 10 мл, после чего оставляли ее на 10 мин в темном месте. Для проведения определения отбирали аликвоту окрашенного раствора (2 мл) и вводили в нее около 100 мкл анализируемого раствора, выбирая количество вводимого раствора так, чтобы поглощение продукта окисления ТМБ уменьшалось на 30 – 60%. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 3 мин и измеряли ее поглощение, определяя содержание антиоксиданта по градуировочному графику.

*Определение антиоксидантной активности в тест-варианте.* Тест-определение с использованием реакции ТМБ–периодат проводили на фильтровальной бумаге (синяя лента). В центр квадрата бумаги размером 1,5×1,5 см наносили исходные реагенты в следующем порядке: 20 мкл  $1 \cdot 10^{-2}$  М раствора ТМБ, 20 мкл раствора исследуемого соединения (для получения цветной шкалы вместо этого наносили 20 мкл  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  М раствора тролокса) и 30 мкл  $1 \cdot 10^{-3}$  М раствора периодата. Спустя 1 мин визуально сравнивали интенсивность окраски образовавшегося синего продукта со шкалой.

Данные, полученные методом окисления ТМБ-персульфатом, сравнили с результатами, полученными стандартным методом – обесцвечивания АБТС-радикала. Среди индивидуальных соединений максимальной антиоксидантной активностью обладает кверцетин. Данные, полученные методами деколоризации продуктов окисления АБТС и ТМБ, близки (табл. 11), что подтверждает пригодность предлагаемого варианта методики.

Продукт окисления ТМБ персульфатом можно использовать для оценки АОА как индивидуальных соединений, так и объектов различной природы. В табл. 1 приведены наши и литературные результаты определения АОА индивидуальных соединений различными методами. Как можно видеть, предлагаемый метод



восстановления продукта окисления ТМБ позволяет получить сигнал для всех трех изученных соединений, причем по чувствительности он не уступает ранее предложенным методам.

Таблица 11 – Значения ТЕАС индивидуальных соединений, полученные с помощью различных методов (наши данные относятся к продуктам восстановления хромогенных реагентов указанными окислителями).

Соединение	CUPRAC [88]	АБТС	Реактив Фолина	FRAP	Миоглобин АБТС	ТМБ-персульфат	АБТС-персульфат
Кверцетин	4,38	2,77	5,17	2,92	4,7±0.1	3,9±0,6	3,2±0,4
Аскорбиновая кислота	0,96	1,03	–	1,01	0,99±0.04	0,8±0,1	0,8±0,1
Галловая кислота	2,62	3,48	1,23	1,85	0,90±0.03	2,5±0,2	3,0±0,4

Вещества, не обладающие антиоксидантной активностью (например, бензиловый спирт, метиламин, теобромин, конваллятоксин, гистамин, меламина, лимонная кислота) не уменьшают поглощение окрашенных соединений. Также не оказывают влияния белки. Так, введение в систему до 2,5 г/л альбумина или глобулина не влияет ни на интенсивность поглощения окрашенного продукта, ни на скорость его образования, что позволяет использовать данный метод для анализа биологических жидкостей. Например, кинетический вариант метода, использующий реакцию окисления ТМБ периодатом, можно использовать для определения АОА мочи: в присутствии мочи, разбавленной водой в 5 раз, скорость реакции уменьшается вдвое, что соответствует эффекту 1,5 ммоль тролокса. В литературе аналогичные значения АОА были получены методом деколоризации АБТС – 1,95 ммоль и методом FRAP – 1,52 ммоль в тролоксовом эквиваленте [89].

Предлагаемым методом определены значения ТЕАС водных настоев (табл. 12) чая (как растения с весьма высокой АОА), а также ромашки и бессмертника (растений, содержание антиоксидантов в которых не столь высоко). При анализе этих объектов потребовались небольшие объемы (микролитры) настоев, причем при высоком разведении (до 1:1000 в случае зеленого чая). Так, если в систему вводят разбавленный в 100 раз 1,5% водный настой зеленого чая, поглощение продукта окисления ТМБ уменьшается на 50%. При большем разбавлении (1:1000) интенсивность поглощения окрашенного продукта снижается на 20-30%.

В реакции ТМБ – периодат компоненты растительного сырья вызывают в больших концентрациях замедление, а в меньших – ускорение реакции (рис. 17).

Таблица 12 – Величины ТЕАС растительных экстрактов, измеренные с помощью восстановления продуктов реакций ТМБ-персульфат и АБТС-персульфат/периодат ( $n = 5, P = 0,95$ )

Объект	ТМБ	АБТС	
	Персульфат	Персульфат	Периодат
Зеленый чай	1,9±0,2	2,6±0,1	3,4±0,2
Черный чай	1,6±0,1	1,8±0,2	2,6±0,3
Цветки ромашки	0,081±0,002	0,09±0,01	0,19±0,01
Цветки бессмертника	0,067±0,003	0,075±0,005	0,159±0,002

Ускорение реакции мы наблюдаем и при введении в систему кверцетина, поэтому ускорение растительными экстрактами может быть связано с присутствием биофлавоноидов. Так или иначе, использование *кинетического* варианта определения по реакции ТМБ–периодат не позволяет оценивать антиоксидантную активность биофлавоноидов и содержащих их растительных экстрактов. Поэтому при исследовании АОА растительного сырья следует использовать *равновесный* вариант этой реакции или реакции ТМБ–персульфат. Введение в систему разбавленных водой (1:10) водных настоев цветков ромашки и бессмертника вызывает уменьшение поглощения окрашенного продукта примерно вдвое (табл. 12).

Показана также возможность использования данной методики в тест-варианте. С помощью шкалы окрасок, получаемой при проведении реакции ТМБ-периодат на бумаге по вышеописанной методике, можно различить концентрации антиоксиданта, отличающиеся на порядок (при концентрациях, соответствующих  $1 \cdot 10^{-4} - 0.003$  М тролокса, – на полпорядка).

Таким образом, предложен способ оценки антиоксидантной активности (АОА) с использованием реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) персульфатом и периодатом в равновесном и кинетическом вариантах с фотометрическим детектированием. Для практических целей удобно применять

реакцию восстановления продукта окисления ТМБ персульфатом. По чувствительности методика не уступает известным, в т. ч. основанным на восстановлении радикала АБТС, и позволяет использовать минимальные объемы (100 мкл) разбавленных растительных экстрактов. Методика проста и экспрессна (на определение требуется 5 мин, на подготовку реагентов – не более 20 мин, в отличие от методики на основе АБТС, где требуется не менее 6 ч). Белки не мешают определению АОА. При определении АОА объектов животного происхождения могут быть использованы и кинетический, и равновесный варианты метода; в случае растительных экстрактов следует использовать равновесный вариант. Предложен тест-вариант метода с визуальным наблюдением окраски на фильтровальной бумаге.

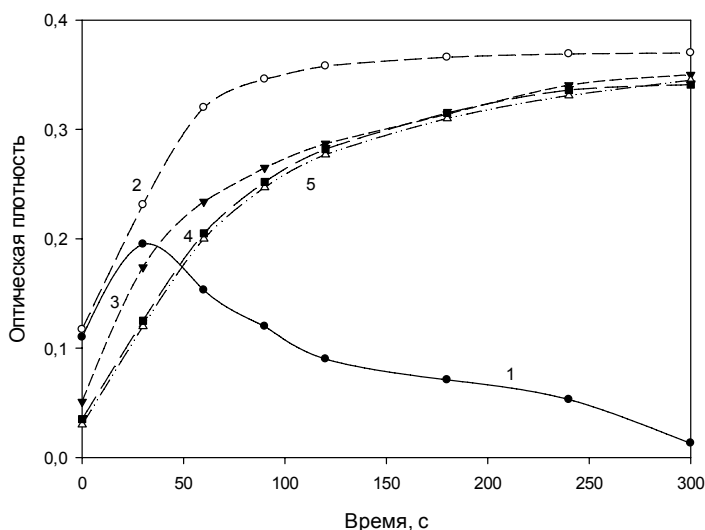


Рисунок 17 – Кинетические кривые восстановления продукта реакции ТМБ–персульфат настоем бессмертника (концентрация, г/мл): 1 -  $2,5 \cdot 10^{-3}$ , 2 -  $4,5 \cdot 10^{-4}$ , 3 -  $4,0 \cdot 10^{-5}$ , 4 -  $3,8 \cdot 10^{-6}$ , 5 – 0 (контрольный образец)

*Концентрирование и определение флавоноидов в реальных объектах.*  
 Предварительно было показано, что поведение флавоноидов при совместной и индивидуальной диффузии различается незначительно. Это позволяет проводить анализ реальных объектов, в которых содержатся различные флавоноиды. Для определения флавоноидов после мембранного разделения возможно использование вышеописанного метода с использованием реакции восстановления продукта окисления ТМБ.

В качестве объектов анализа выбраны экстракты растений с высоким содержанием кверцетина и нарингенина: грейпфрута, бессмертника, шелухи красного лука, а также настойка эвкалипта. Методом ВЭЖХ определено содержание флавоноидов в исходных экстрактах и результаты сравнены с приведенными в литературе для аналогичных образцов.

Определение флавоноидов после их предварительного мембранного разделения проводили с использованием реакции восстановления продукта окисления ТМБ. Диффузионное разделение с использованием молекулярно-импринтированных мембран проводили аналогично тому, как это делали в случае индивидуальных флавоноидов.

Кверцетин в красном луке является основным флавоноидом, и тем не менее, его определению по собственному поглощению мешают другие соединения, поэтому требуется его селективное извлечение. После диффузии через импринтированную мембрану пик кверцетина в спектре пермеата четко различим. На рис. 18 приведен пример УФ-спектров экстракта красного лука до и после диффузии через импринтированную кверцетином и неимпринтированную мембраны. Таким образом, возможно спектрофотометрическое определение кверцетина (и, аналогичным образом, нарингенина) в экстрактах растительных объектов после диффузии через импринтированные мембраны.

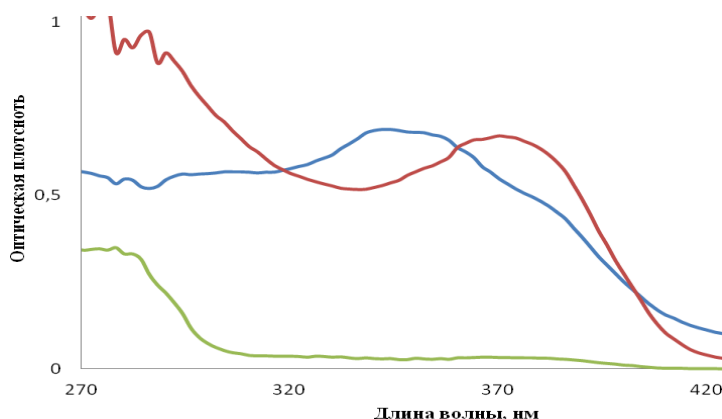


Рисунок 18 – УФ-спектры: экстракт лука до диффузии (в исходной фазе 4,3 мг/л кверцетина), экстракт лука после диффузии через импринтированную кверцетином мембрану (пермеат: 6,3 мг/л кверцетина), экстракт лука после диффузии через неимпринтированную мембрану (пермеат: 0,3 мг/л кверцетина).

При анализе объектов в пермеате спектрофотометрически нашли количества флавоноидов, соответствующие ожидаемой степени их переноса через мембрану в использованных условиях ( $29 \pm 4\%$ ).

*Методика мембранного концентрирования биофлавоноидов.* Аликвоту экстракта объекта объемом 200 мкл помещали в верхнюю часть ячейки (принимающий раствор – ТГФ, исходный раствор – ТГФ-ацетатный буфер рН 5.2 (20:80, об.), общий объем исходной фазы – 2.0 мл. Длительность диффузии составляла 15 мин. После этого отбирали пермеат, в случае необходимости проводили его разбавление и анализировали фотометрическим методом, используя продукт окисления ТМБ персульфатом в качестве реагента, как указано ниже

*Методика определения биофлавоноидов в пермеате по реакции с ТМБ.* К 3.0 мл окрашенного продукта окисления ТМБ добавляли 0,1 мл пермеата и спустя 30 с измеряли оптическую плотность при 600 нм. Строили зависимость аналитического сигнала  $\Delta A$  от концентрации кверцетина/нарингенина, введенной в раствор продукта окисления ТМБ.

Характеристики разработанных методик определения кверцетина и нарингенина фотометрическим методом приведены в табл. 13.

Таблица 13 – Характеристики методик определения биофлавоноидов в пермеате после мембранной диффузии через молекулярно-импринтированные мембраны, полученные в присутствии никеля(II).

Аналит	Параметры уравнения $y = a + bx$ , где $x - c(\text{моль/л} \cdot 10^3)$ , $y - \text{оптическая плотность } A_0 - A$				$n$	Предел обнаружения, М*	$c_{\text{н}}, \text{М}$
	$a$	$s_a$	$b$	$s_b$			
Кверцетин	0,058	0,006	1,935	0,028	10	$9 \cdot 10^{-6}$	$2.2 \cdot 10^{-5}$
Нарингенин	0,055	0,005	2,143	0,035	11	$7 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$

\* Рассчитаны по формуле:  $c_{\text{min}} = 3s_a/b$

*Проверка правильности определения биофлавоноидов методом ВЭЖХ.* Полученный экстракт объекта анализировали методом ВЭЖХ, для чего в колонку вводили 20 мкл исходного раствора анализируемого объекта. Результаты приведены в табл. 14.

Таблица 14 – Проверка правильности определения биофлавоноидов в объектах фотометрическим методом после диффузии (определяли флавоноид, который был темплатом при получении мембраны)

Объект	Флавоноид	Концентрация флавоноида в исходной фазе по данным ВЭЖХ, $c_{исх}$ , мг/л	Концентрация флавоноида в принимающей фазе $c_{перм}$ , мг/л	
			по данным ВЭЖХ с учетом степени переноса (29±4)%	по результатам фотометрического определения
<i>Красный лук</i> (спиртовой экстракт из шелухи)	Кверцетин	85	24,7	26,1 ± 1,5
<i>Эвкалипт</i> (аптечная настойка)		3,8	1,1	1,0 ± 0,1
<i>Грейпфрут</i> (спиртовой экстракт из цедры с мякотью)	Нарингенин	70	20,3	21 ± 2
<i>Бессмертник</i> (спиртовой экстракт из аптечного сухого сырья)		24	7,0	8,1 ± 0,6

Таким образом, предложены методики получения мембран, импринтированных биофлавоноидами), определения антиоксидантной активности индивидуальных восстановителей и растительных экстрактов фотометрическим методом по реакции с окрашенным продуктом окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина персульфатом, а также методика определения индивидуальных биофлавоноидов (кверцетина и нарингенина) по названной реакции в принимающей фазе после мембранного разделения с пределами обнаружения  $9 \cdot 10^{-6}$  и  $7 \cdot 10^{-6}$  моль/л, соответственно.

Таким образом, разработана методика селективного определения отдельных групп антиоксидантов (включая биофлавоноиды) в растительных экстрактах и

пищевых продуктах, обеспечивающая определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-5}$  М.

## 2.5. Разработка методики полупрепаративного хроматофокусирования 8 – 10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием

Роль подвижных фаз - стартового раствора и буферного элюента – очень важна при создании градиентов рН в колонке с сульфокатионообменным сорбентом, не проявляющем буферные свойства. Для упрощения системы и установления влияния отдельных компонентов подвижной фазы на профиль градиента создали равную концентрацию лимонной кислоты и Трис в стартовом растворе и в элюенте (рис. 1, кривая 1). В течение 6 - 7 мин рН на выходе из колонки оставался постоянным после начала пропускания элюента, поэтому на рисунке приведены наиболее информативные участки градиентов, начиная с 6 мин. Градиент, представленный на кривой 1, линеен при рН 3,5 - 6,2, однако его линейный участок продолжается около 3 мин, что недостаточно для препаративных целей. На сильнокислотном катионообменнике сложно создать достаточно протяженный по времени линейный градиент рН, так как сульфогруппы сорбента практически не участвуют в протолитических равновесиях в этой области рН и оказывают незначительное сопротивление при переуравновешивании сорбента. При разбавлении элюента в 2 раза и сохранении концентрации стартового раствора градиент рН параллельно смещается по оси абсцисс без изменения характерных участков (рис. 1, кривая 2). Однако при добавлении в элюент инертного компонента (т.е. явным образом не определяющего рН) – NaCl – до концентрации 0,05 М форма градиента становится более плавной.

Линейный участок градиента рН продолжается от 3 до 6,5, наклон линейного участка заметно уменьшается, увеличивая время выхода до 7 мин (рис. 19, кривая 3).

Изученную систему (стартовый раствор – 10 мМ лимонная кислота + Трис, элюент – 5 мМ лимонная кислота + Трис + 0,05 М NaCl) применили для полупрепаративного разделения пептидов, полученных трипсинолизом ЧСА. Однако, достаточно высокий собственный сигнал цитратного элюента при рекомендованных для пептидов длинах волн 206 – 214 нм затруднил УФ-

детектирование неароматических пептидов. Переход к стартовому раствору и элюенту, содержащим буферный раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  в качестве активного компонента, позволил решить проблему высокого уровня фонового поглощения и вместе с тем получить достаточно протяженный градиент pH.

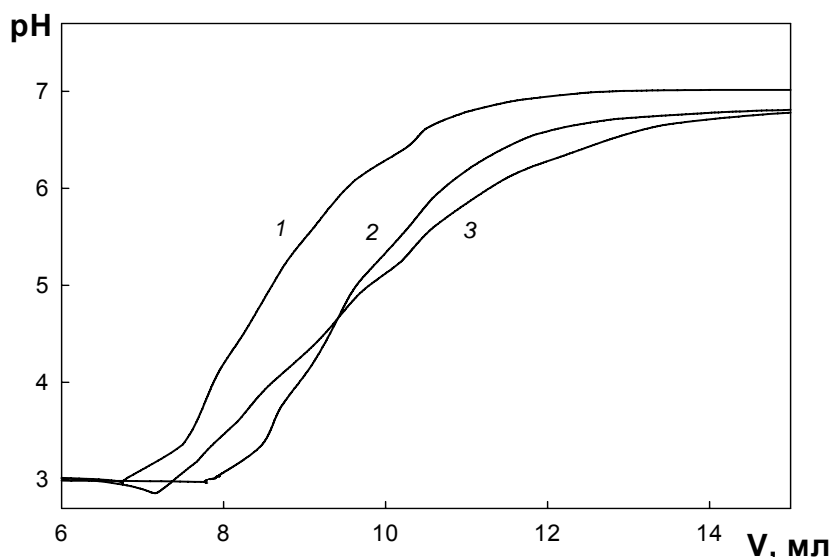


Рисунок 19 – Формирование градиента pH цитратным буферным элюентом на сульфокатионите PRP-X200. Стартовый раствор: 10 мМ лимонная кислота + Трис (pH 3,0), элюент: (pH 7,0): 1 - 10 мМ лимонная кислота + Трис (pH 7,0), 2 - 5 мМ лимонная кислота + Трис (pH 7,0), 3 - 5 мМ лимонная кислота + 4 мМ Трис + 0,05 М NaCl (pH 7,0); 1 мл/мин. Остальные условия в тексте.

*Фосфатные буферные подвижные фазы.* В элюент добавили Трис для расширения диапазона буферной емкости. При отсутствии ионной силы в обеих подвижных фазах наблюдали линейное изменение pH от 3,5 до 6,8 в течение 2,5 - 3 мин, что непригодно для задач разделения (рис. 20, кривая 1). При использовании элюента, содержащего 0,3 М сильного электролита, наблюдали аналогичный градиент pH, только со сдвигом по времени (рис. 20, кривая 2). Создание высокой ионной силы (0,1 - в стартовом растворе и 0,3 - в элюенте) не привело к принципиальным изменениям профиля градиента, однако pH увеличивался еще позже (кривая 3). Вероятно, такой сдвиг градиента pH по времени объясняется неравновесным ионным обменом  $\text{H}^+$  на  $\text{Na}^+$  на сульфогруппах сорбента при высокой концентрации  $\text{Na}^+$ . Наиболее протяженный градиент, линейный при pH от



3,1 до 6,8, наблюдали в случае добавок сильного электролита (0,5 М) только в стартовый раствор. Время выхода градиента составило более 10 мин, что уже вполне пригодно для применения такого градиента в аналитических целях (кривая 4). Профиль градиента для системы: стартовый раствор - 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,5 М  $\text{NaCl}$ , элюент - 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис имеет наименьший наклон линейного участка ( $\Delta\text{pH}/\Delta V = 0,38$ ), что вполне приемлемо для применения выбранных условий при разделении. Вместе с тем, градиент рН, представленный на кривой 3, представляется перспективным для использования в полупрепаративных целях, поскольку в данных условиях одновременно с ним создается восходящий градиент ионной силы (от 0,1 до 0,3).

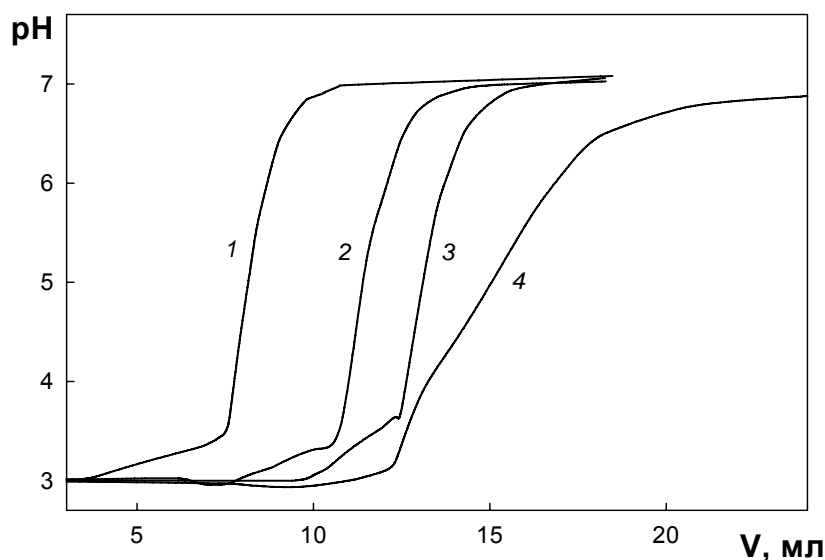


Рисунок 20 – Влияние ионной силы подвижных фаз на профиль градиента рН в сильнокислотной катионообменной системе. Стартовый раствор: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 3,0), ионная сила: 1, 2 - 0; 3 - 0,1; 4 - 0,5. Элюент: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис (рН 7,0), ионная сила: 1, 4 - 0; 2 и 3 - 0,3. Остальные условия – см. рис. 19.

*Ионная сила стартового раствора.* Изучили удерживание пептидов в изократических условиях при пропускании стартового раствора (5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 3), одновременно проверяли возможность УФ-детектирования пептидов при 214 нм. При введении 50 мкл полученного трипсинового гидролизата ЧСА в данных условиях наблюдали только 5 - 6 пиков наименее удерживаемых пептидов (рис. 21). Разрешение  $R_s$  соседних пиков, кроме пары "второй – первый пик", составляет от 1,5 до 2, что говорит о количественном отделении

хроматографических зон элюируемых пептидов. Относительно невысокая оптическая плотность 0,04 (для наиболее интенсивного пика) указывает на малый размер элюирующихся пептидов (чем больше пептидных связей, тем сильнее поглощает пептид в УФ-области). Эти пептиды неароматические, так как для ароматических пептидов характерно сильное удерживание на колонке и более высокий сигнал.

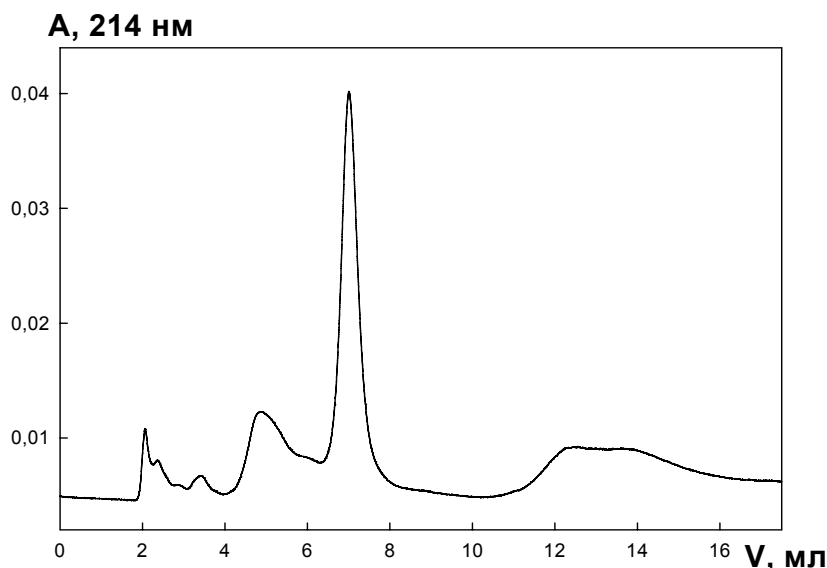


Рисунок 21 – Хроматограмма трипсинового гидролизата ЧСА (0,1 мг) в условиях сильного удерживания пептидов на колонке (изократический режим).

Элюент: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 3,0). Остальные условия – см. рис. 20.

Для создания условий, при которых пептиды должны значительно слабее удерживаться на сорбенте (или практически не удерживаться), добавили в подвижную фазу сильный электролит – 0,5 М  $\text{NaCl}$ . На хроматограмме (рис. 22) можно выделить шесть пептидных пиков, причем УФ-сигнал в среднем на порядок больше, чем на предыдущей хроматограмме (рис. 21), а для наиболее интенсивного пика оптическая плотность равна 0,75. В условиях слабого удерживания наблюдаются пики не индивидуальных пептидов, а сразу нескольких веществ. Увеличение УФ-сигнала косвенно подтверждает, что в этих условиях через 15 мин после введения пробы из колонки элюируются даже крупные и сильно заряженные олигопептиды. Высокая ионная сила подвижной фазы способствует тому, что большая часть пептидов не удерживается на колонке и выходит практически сразу после мертвого объема системы (~2 мин). В данных условиях невозможно

разделить малые слабоудерживающиеся пептиды, как это удалось в отсутствие сильного электролита. Разрешение  $R_s$  хроматографических пиков олигопептидов, элюирующихся начиная с 4-ой мин, составляет от 0,8 до 3, что может быть использовано при полупрепаративном отделении олигопептидов от низших пептидов.

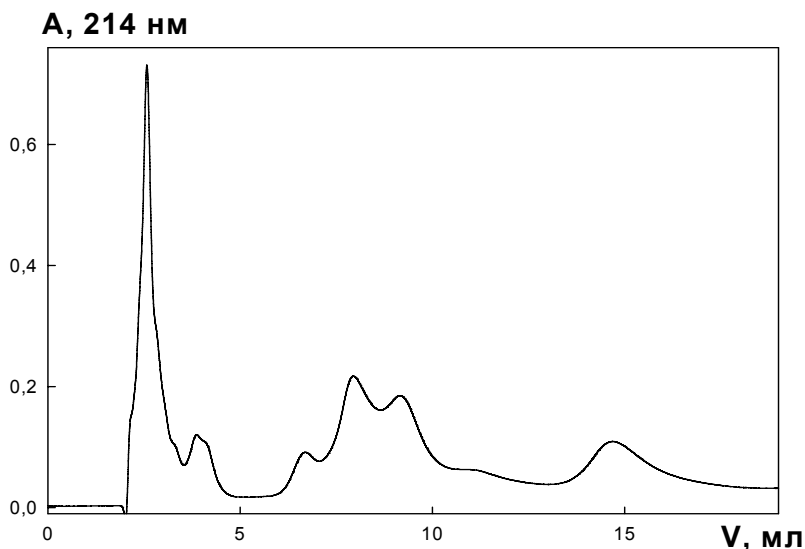


Рисунок 22 – Хроматограмма трипсинового гидролизата ЧСА (0,1 мг) в условиях слабого удерживания пептидов на колонке (изократический режим). Элюент: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,5 М  $\text{NaCl}$  (рН 3,0). Остальные условия – см. рис. 20.

При повышении ионной силы стартового раствора увеличивается протяженность градиента рН, а, следовательно, и разрешение пиков, относящихся к пептидам с близкими изоэлектрическими точками – за счет фокусирующего эффекта. Вместе с тем, добавление сильного электролита в стартовый раствор приводит к более слабому удерживанию пептидов на колонке, что сокращает возможное число разделяемых данным методом пептидов. Возможным решением может служить введение образца трипсинового гидролизата уже во время формирования градиента рН, а не во время пропускания стартового раствора с высокой ионной силой. В случае введения 0,1 мг образца трипсинового гидролизата ЧСА после замены стартового раствора на элюент удастся разделить до 9 пептидов (рис. 23). Градиент рН показан пунктиром.

Первые 5 пиков, относящиеся к слабоудерживающимся пептидам, выходят в течение 15 мин в области рН от 3,2 до 5,5. Разрешение  $R_s$  соседних пиков составляет от 1,4 до 2 (пики разделяются практически до базовой линии), за

исключением пары "пик №3 – пик №2" ( $R_s$  0,7). Пики 8 и 9, относящиеся к сильноудерживаемым пептидам, выходят уже после завершения градиента рН. Хроматографические пики пептидов, элюирующихся после 15 мин, представлено в увеличенном виде на рис. 24. Разрешение пиков  $R_s$  составляет 0,75 – 0,95.

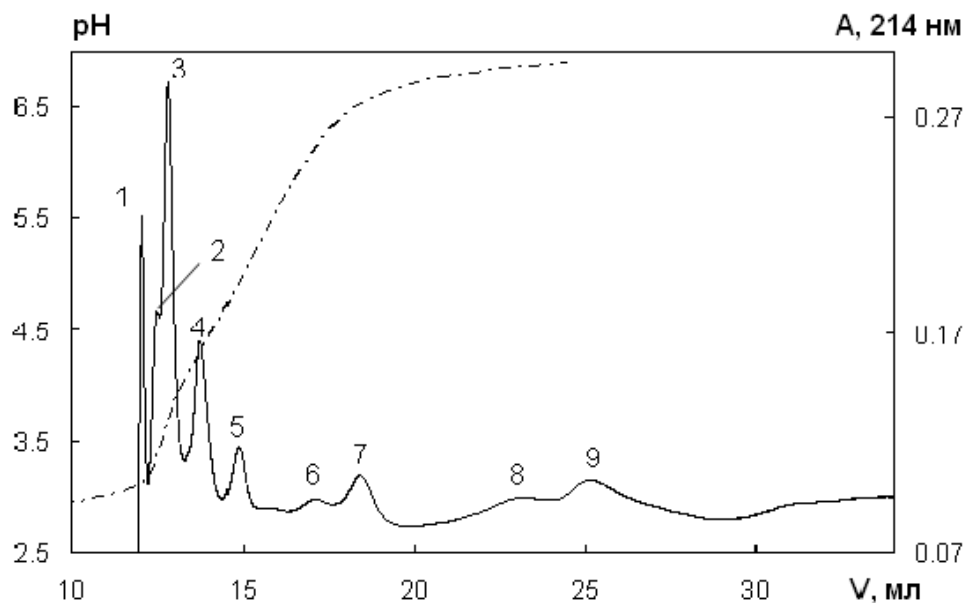


Рисунок 23 – Хроматофокусирование трипсинового гидролизата ЧСА (0,1 мг) при введении пробы во время формирования градиента рН. Стартовый раствор: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,5 М  $\text{NaCl}$  (рН 3,0); элюент: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис (рН 7,0). Остальные условия – см. рис. 20.

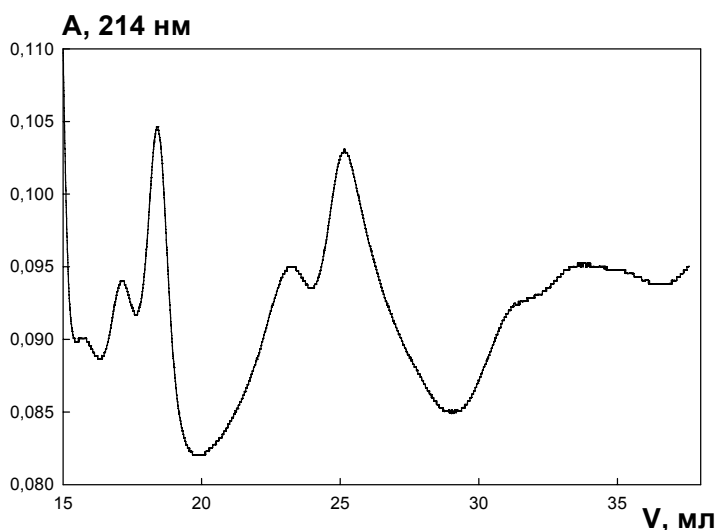


Рисунок 24 – Участок хроматограммы (рис. 23) от 15 до 40 мин в увеличенном масштабе по оси ординат.

*Влияние добавок ацетонитрила в подвижные фазы.* Помимо ионной силы на разделение пептидов могут влиять добавки органического растворителя, например,

ацетонитрила, в подвижные фазы. Ацетонитрил снижает вклад гидрофобных взаимодействий ароматических пептидов с матрицей сорбента, если они имеют место. Поэтому далее образец ЧСА вводили во время пропускания стартового раствора, а чтобы разделяемые пептиды удерживались на колонке, в стартовый раствор сильный электролит не добавляли.

Полученную хроматограмму (рис. 25) можно разделить на три участка по принципу элюирования пептидов. В течение 5 мин элюируются малые слабоудерживаемые пептиды (участок хроматограммы показан в увеличенном виде в рамке). Разрешение  $R_s$  соседних пар пиков на этом участке составляет не менее 0,75. Слабоудерживаемые пептиды характеризуются низким светопоглощением при 214 нм, что говорит о наличии в их составе 1 – 2 пептидных связей. На участке от 5 до 14 мин (в течение собственно градиента рН) элюируется до 8 пиков, обладающих более сильным светопоглощением. Это олигопептиды, состоящие из большего числа аминокислот; кроме того, в состав пептидов могут входить группы, существенно поглощающие при 214 нм, например, ароматические. Разрешение  $R_s$  пиков для пары "№8 – №7" составляет 0,75, для остальных пар – от 1,6 до 2,2.

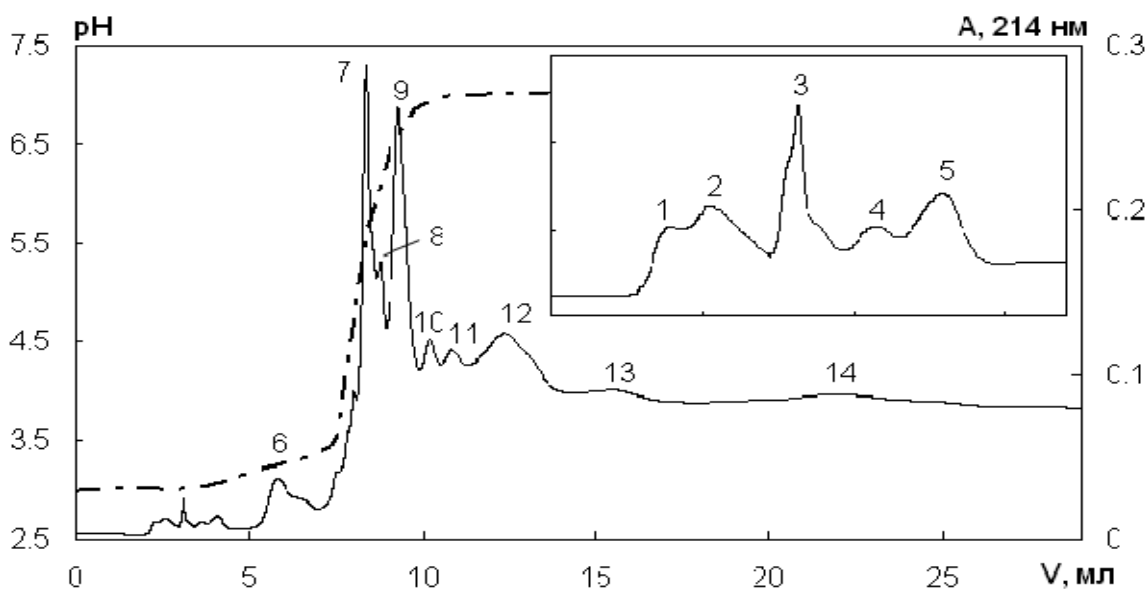


Рисунок 25 – Влияние добавок ацетонитрила на разделение пептидов в условиях градиента рН. Стартовый раствор: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 3,0); элюент: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 7,0). Проба 0,1 мг ЧСА.

Остальные условия – см. рис. 20.

На третьем участке хроматограммы при рН 7 (отдельно представлен на рис. 26) от 14 мин и далее элюируются сильноудерживаемые пептиды, имеющие достаточно высокие значения изоэлектрических точек; возможно также элюирование белка, не полностью прореагировавшего с трипсином. Разрешение  $R_s$  соседних хроматографических пиков, представленных на рис. 26, составляет 1,22 – для второго и первого пика, выше 1,75 – для третьего и второго. Таким образом, удается зарегистрировать около 15 пиков.

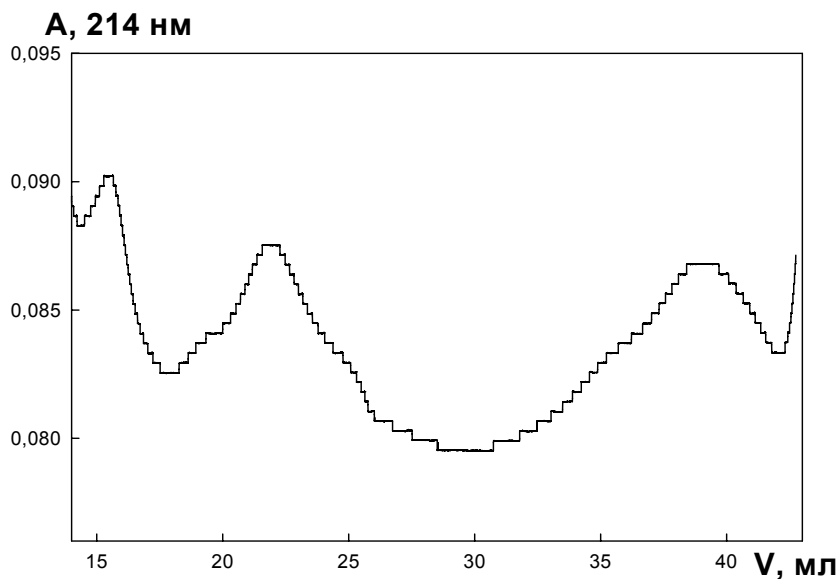


Рисунок 26 – Участок хроматограммы (рис. 25) от 14 до 45 мин в увеличенном масштабе по оси ординат.

*Ионная сила элюента.* Добавление сильного электролита в состав элюента должно приводить к уменьшению удерживания пептидов на сорбенте и, соответственно, к сужению формы пиков сильноудерживаемых компонентов. На начальном участке хроматограммы, полученной при создании в элюенте ионной силы 0,1 (рис. 27), наблюдали набор пиков, аналогичный представленному на рис. 25. Однако за счет присутствия сильного электролита в элюенте некоторые пики, которые ранее были разрешены, слились в один. В области 13 - 14 мин появился острый высокий пик, соответствующий резкому изменению рН внутри колонки и завершению градиента, что подтвердилось проверкой базовой линии без ввода пробы. Таким образом, увеличивается эффективность разделения за счет высокой ионной силы в элюенте, но при этом снижается селективность.

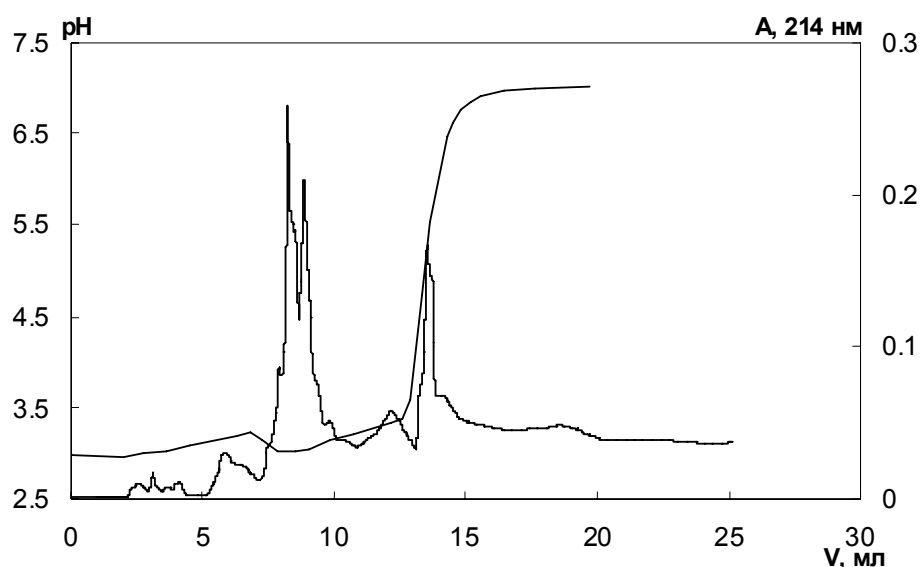


Рисунок 27 – Хроматофокусирование трипсинового гидролизата ЧСА при высокой ионной силе элюента. Стартовый раствор: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 3,0); элюент: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + Трис + 0,1 М  $\text{NaCl}$  + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 7,0).

Остальные условия – см. рис. 20.

Дальнейшее повышение концентрации сильного электролита (до 0,3 М) в составе элюента снижает селективность разделения и заметно повышает уровень фонового сигнала. В области 5 – 14 мин на хроматограмме наблюдали только 4 пика вместо 5, причем последний из них вызван изменением рН. Начиная с 14 мин, когда градиент рН уже достиг конечного значения, наблюдается еще 4 более размытых, но достаточно симметричных пика. Отсутствуют разделенные пики слабоудерживаемых малых пептидов, элюировавшихся до 5 мин при добавлении ацетонитрила в подвижные фазы (рис. 25, 27).

Также проверяли удерживание пептидов в изократических условиях при пропускании элюента с рН 7,0 и высокой (до 0,3) ионной силой. В этих условиях, несмотря на создание высокой ионной силы в элюенте, многие компоненты трипсинового гидролизата удерживаются на колонке довольно сильно - до 20 мин. Помимо пика неудерживаемых соединений (около 2 мин), на хроматограмме наблюдали еще 5 более размытых пиков. Таким образом, следует подбирать условия разделения, при которых малые пептиды будут удерживаться на колонке и не элюироваться с мертвым объемом системы, а сильноудерживаемые пептиды с высокими значениями  $R_f$  будут выходить в виде более симметричных пиков.

*Одновременное влияние ионной силы и добавок ацетонитрила.*

Селективность разделения можно увеличить при использовании более разбавленных стартовых растворов в сочетании с высокой ионной силой в обеих подвижных фазах и добавками ацетонитрила (10%). При создании ионной силы до ~0,1 в стартовом растворе и большей (до 0,3) в элюенте можно разделить слабоудерживаемые нисшие пептиды, элюирующиеся от 3 до 6 мин (рис. 28).

Градиент ионной силы положительно влияет на форму пиков при разделении пептидов. Градиент рН на рисунке показан пунктирной линией. Увеличенная часть хроматограммы, относящаяся к разделению слабоудерживаемых пептидов, отдельно представлена на рис. 29 (пики 1 - 7).

В этих условиях удастся регистрировать сигнал и сильнозаряженных пептидов, удерживающихся более 15 мин (рис. 10, пики 12 – 15). На рис. 29 этот участок хроматограммы показан в увеличенном масштабе. При проведении контрольного опыта (в отсутствие пробы ЧСА) пиков на базовой линии не наблюдали. Добавление ацетонитрила препятствует размыванию пиков за счет уменьшения гидрофобных взаимодействий с матрицей сорбента, что также улучшает разрешение. Таким образом, в трипсиновом гидролизате при восходящем градиенте ионной силы удастся детектировать до 10-15 пептидов при разрешении  $R_s$  соседних хроматографических пиков не ниже 0,75 – 1,0. В аналогичных условиях достигнуто разделение 10 пептидов, полученных трипсиновым гидролизом бычьего сывороточного альбумина.



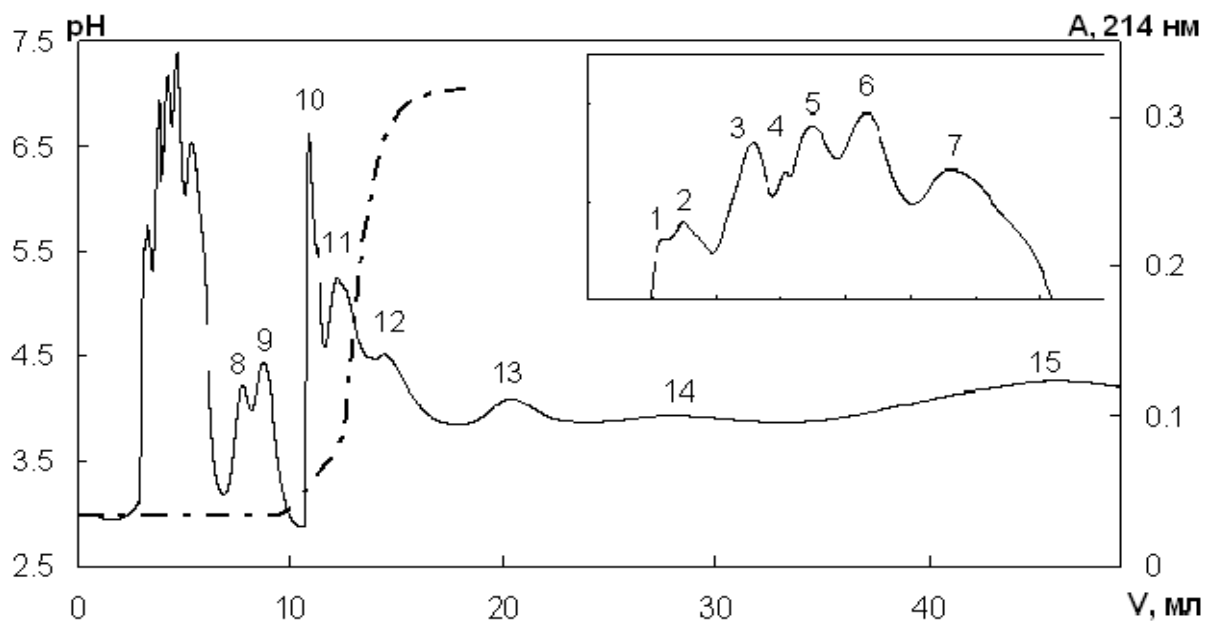


Рисунок 28 – Хроматофокусирование трипсинового гидролизата ЧСА (0,1 мг) при одновременном градиенте ионной силы. Стартовый раствор: 3 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,1 М  $\text{NaCl}$  + 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 3,0); элюент: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис + 0,3 М  $\text{NaCl}$  + 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 7,0).

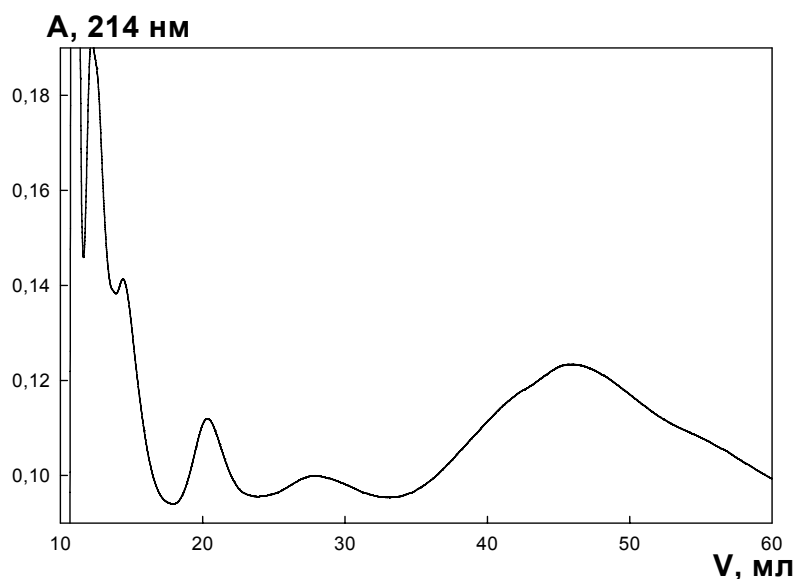


Рисунок 29 – Участок хроматограммы (рис. 28) от 10 до 60 мин в увеличенном масштабе по оси ординат.

В качестве рекомендаций по хроматофокусированию пептидов на сульфокатионообменниках с простыми элюентами предлагается использовать добавки ацетонитрила (до 10-20 %) и сильного электролита (до 0,1 – 0,3 М  $\text{NaCl}$ ) в

обе подвижные фазы (при этом ионная сила в элюенте должна быть выше, чем в стартовом растворе).

Методика полупрепаративного хроматофокусирования олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием:

Хроматографическую колонку, заполненную сильнокислотным катионообменным сорбентом PRP-X200 (полистиролдивинилбензол с привитыми сульфогруппами, размер частиц 10 мкм), уравнивают стартовым раствором (3 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  либо 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; pH 3,0;  $I_{\text{NaCl}}=0,1$  М) при скорости 1 мл/мин до совпадения pH эфлюента и стартового раствора, вводят в инжектор 100 мкл раствора трипсинового гидролизата, полученного при обработке сывороточного альбумина (ЧСА, БСА) раствором трипсина (1 мг/мл) в 50 мМ Трис-НСl при 37 °С. Затем переключают стартовый раствор на элюент (10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис + 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; pH 7,0;  $I_{\text{NaCl}}=0,3$  М). Детектирование – УФ, при 214 нм. Регистрируют профиль оптической плотности в условиях одновременных градиента ионной силы и градиента с восходящими значениями pH. Отделяют элюируемые пептиды в полупрепаративном масштабе, собирая фракции эфлюента (0,25 мл) в коллектор. Разрешение соседних хроматографических пиков  $R_s$  составляет от 0,75 – 1,0 ( $n = 3$ ).

Таким образом, разработана методика полупрепаративного хроматофокусирования 8-10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием, обеспечивающая разрешение хроматографических пиков не менее 0,75-1,0.

2.6. Разработка способа установления влияния добавки гексафторида серы (0 – 40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок

Эксперименты проводили в реакторе с ВЧ индукционным источником плазмы. Плазмохимический реактор состоит из двух камер – разрядной и реакционной. Разряд зажигали в разрядной камере – кварцевом стакане (диаметр 10 см и длина 15 см) с помощью ВЧ генератора ( $f=13,56$  МГц,  $W=1$  кВт). Из разрядной камеры плазма диффузно распространялась в реакционную

металлическую камеру (диаметр 30 см). Для управления равномерностью травления и повышения плотности заряженных частиц реакционную камеру помещали в магнитное поле катушки. В реакционной камере на расстоянии 7,5 см от нижнего края разрядной камеры расположен плоский ВЧ электрод диаметром 16 см. На него устанавливали кассету с кремниевой пластиной. В качестве образцов, на которые осаждали пленку, служили пластинки монокристаллического кремния толщиной 0,4 мм и площадью 5 – 100 см<sup>2</sup>. Для управления энергией падающих ионов на электрод подавали определенную мощность ВЧ смещения от отдельного ВЧ генератора ( $f=13,56$  МГц). При этом на электроде образовывался постоянный отрицательный потенциал самосмещения, который определял энергию ионов. Откачку газов осуществляли с помощью турбомолекулярного насоса (400 л/с). Предельный остаточный вакуум составлял  $2 \times 10^{-4}$  Па. Эксперименты проводили при давлении 1 – 7 Па и ВЧ-мощности 800 Вт.

Скорость осаждения пленок определяли лазерно-интерферометрическим методом (He-Ne лазер, 633 нм) или посредством измерений толщины осаждаемой пленки за определенное время. При этом точность измерения скорости осаждения ФУП составила 0,1 нм/с.

Контроль состава плазмы осуществляли спектральным методом. Спектр излучения плазмы регистрировали с помощью монохроматора Jobin-Yvon H20 UV с ФЭУ Hamamatsu R928 диагностического комплекса MULTISEM 440. Область регистрируемого излучения плазмы находилась над поверхностью держателя подложки. Для реализации актинометрического метода измерения относительной концентрации  $CF_2$ ,  $C_2$ , F в плазму добавляли в небольшой концентрации (<5%) аргон. Относительную концентрацию атомов фтора, радикалов  $CF_2$  определяли по отношению интенсивности линий излучения атомов F ( $\lambda=685,6$  нм) и радикалов  $CF_2$  ( $\lambda=257,3$  нм).

Элементный и химический состав ФУП определяли методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). РФЭ спектры ФУП измеряли на электронном спектрометре Leybold LHS-10 (Германия) сначала в режиме постоянного относительного энергетического разрешения (обзорные спектры для определения элементного состава), а затем в режиме абсолютного энергетического разрешения (спектры уровня C 1s для определения химического состава)

электростатического полусферического анализатора (ПСА) энергий. В качестве источника возбуждения РФЭ спектров использовали рентгеновское излучение Mg *Kα* с энергией  $h\nu=1253,6$  эВ или Al *Kα* с энергией  $h\nu=1486,6$  эВ. Точность измерения кинетических энергий ( $E_{кин}$ ) и энергий связи ( $E_{св}$ ) фотоэлектронов – 0,1 эВ и 0,5 эВ в режиме постоянного абсолютного и постоянного относительного энергетического разрешения соответственно. Глубина отбора аналитической информации составляет 3-5 нм. Вакуум в камере анализа спектрометра поддерживали на уровне  $10^{-7}$  Па.

Для определения элементного состава плазмополимеризованных ФУП в обзорных РФЭ спектрах идентифицировали спектральные линии с  $E_{кин}$ , равными 796,4 эВ, 1194,6 эВ и 1451,5 эВ. Затем с помощью уравнения Эйнштейна:

$$h\nu = E_{кин} + E_{св}$$

рассчитывали  $E_{св}$  фотоэлектронов, которые равны 690,2 эВ, 292,0 эВ и 35,1 эВ. Согласно табличным данным эти значения  $E_{св}$  соответствуют уровням F 1s, C 1s и F 2s. Кроме того, в спектрах имеется линия с  $E_{кин}$ , равной 652,0 эВ. Это значение  $E_{кин}$  соответствует возбуждаемому рентгеновским излучением оже-электронному переходу F  $KL_{23}L_{23}$ . Таким образом, было установлено, что пленки содержат углерод и фтор. В образцах может быть также обнаружена линия уровня O 1s с  $E_{св}$  530,0 эВ. Отсутствие в спектрах сигнала кремния свидетельствует о том, что толщина пленок превышает глубину отбора аналитической информации, а сами пленки являются сплошными.

Расчет количественного содержания элементов проводили по формуле:

$$n_i = \left( \frac{I_i}{\sigma_i} / \sum_{i=1}^m \frac{I_i}{\sigma_i} \right) \cdot 100 (\% \text{ ат.}),$$

где  $I$  – интенсивность спектральной линии,  $\sigma$  – сечение фотоионизации электронного уровня,  $n$  – содержание элемента. В расчетах использовали следующие значения сечений фотоионизации  $\sigma$ : 1,00 и 4,26 для уровней C 1s и F 1s соответственно. Результаты расчетов элементного состава и стехиометрии пленок по данным РФЭС представляют в виде таблицы. Предел обнаружения углерода, фтора и кислорода в ФУП равен 0,1 ат.% при использовании режима постоянного относительного энергетического разрешения ПСА. Воспроизводимость результатов анализа составила 7,0 %.

Для определения химического состава плазмополимеризованных ФУП в РФЭ спектрах уровня  $C 1s$  проводили вычитание нелинейного фона, а затем разложение на составляющие этих спектров с учетом химических сдвигов, возникающих в результате образования в пленках химической связи между атомами углерода и фтора. При этом использовали следующие значения  $E_{св}$  уровня  $C 1s$ : 294,7 эВ для  $C-F_3$  связи, 292,4 эВ для  $C-F_2$  связи, 289,2 эВ для  $C-F$  связи, 286,7 эВ для  $C-CF_n$  связи и 284,3 эВ для  $C-C$  связи.

Расчет количественного содержания различных химических состояний ( $C-F_3$ ,  $C-F_2$ ,  $C-F$ ,  $C-CF_n$  и  $C-C$ ) в ФУП проводили с помощью интегрирования компонентов, на которые был разложен спектр уровня  $C 1s$ . Точность определения химического состава равна 1,0 %.

Известно, что стенки реактора влияют на процесс полимеризации во фторуглеродной плазме. Поэтому осаждение каждый раз проводили после предварительной очистки стенок реактора в кислородной плазме. После очистки стенок скорость роста ФУП, измеренная лазерно-интерферометрическим способом, была постоянна во времени в течение 3 минут, хотя с момента включения разряда давление увеличивалось. Быстрое увеличение давления наблюдали в течение первой минуты. В  $C_4F_8$  плазме за 120 с давление возрастало с 0,27 до 0,82 Па. Изменение давления наблюдали только в плазме  $C_4F_8+SF_6$  с добавкой  $SF_6$  менее 30%.

Спектр плазмы после включения плазмы  $C_4F_8$  изменялся во времени. В спектре плазмы различаются широкие полосы излучения радикалов  $CF_2$  с максимумом излучения при  $\lambda=263,3$  нм и две интенсивные полосы излучения  $C_2$  с максимумом при  $\lambda=516,5$  и 468,2 нм. Кроме этого, наблюдали полосу с максимумом при  $\lambda=405,4$  нм, которую можно отнести к излучению возбужденных молекул  $C_3$ . Интенсивность излучения атомов фтора ( $\lambda=685,6$  и 703,7 нм) была слабой. Небольшая добавка  $SF_6$  в плазму приводила к сильному изменению спектра плазмы. В спектре стала быстро возрастать линия излучения с максимумом  $\lambda=257,6$  нм, а излучение остальных широких полос, за исключением полосы  $C_2$  ( $\lambda=516,5$ ), стало уменьшаться. Необходимо отметить, что широкие полосы излучения радикалов  $CF_2$  и  $C_2$  становились очень узкими. В спектре излучения

плазмы  $C_4F_8+40\%SF_6$  наблюдали два интенсивных пика, соответствующих их излучению при  $\lambda=257,6$  (0) и  $516,5$  нм (6) и слабые пики  $C_2$  (4,5) и  $C_3$  (3) (рис. 30).

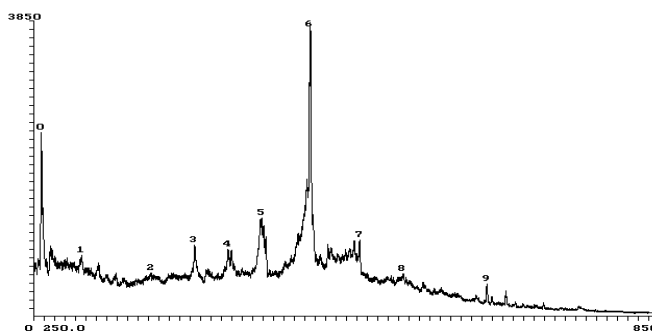


Рисунок 30 – Спектр  $C_4F_8+SF_6$  плазмы ( $P=0,82$  Па,  $W= 800$  Вт).

Зависимость скорости осаждения ФУП на поверхности кремния в  $C_4F_8 +SF_6$  плазме от добавки  $SF_6$  была различной при изменении ВЧ мощности подаваемой на подложку (рис. 31). Если без ВЧ смещения скорость образования ФУП с увеличением  $SF_6$  сначала увеличивалась, а затем уменьшалась (кривая 1), то при  $W=20$  Вт падение скорости осаждения начиналось при меньшем содержании  $SF_6$  в смеси (кривая 2). Аналогичные по виду зависимости скорости осаждения ФУП наблюдались с увеличением ВЧ мощности смещения. Без добавки  $SF_6$  скорость осаждения ФУ пленки сначала увеличивалась, а затем уменьшалась, а при 20% содержании  $SF_6$  в плазме она быстро падала с ростом ВЧ смещения.

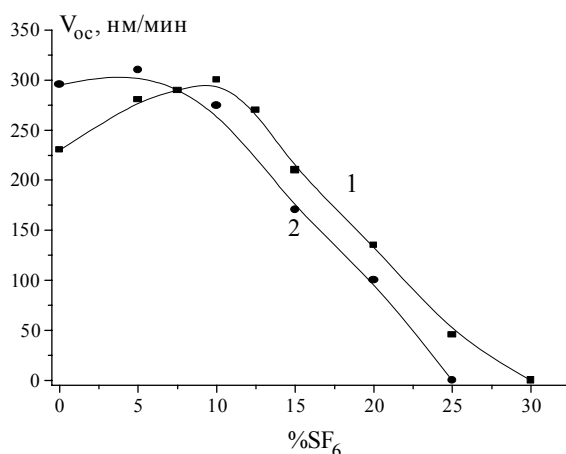


Рисунок 31 – Зависимость скорости осаждения ФУП в  $C_4F_8+SF_6$  плазме от добавки  $SF_6$ .  $W_{см}=0$  (1),  $W_{см}=20$  Вт (2). ( $P=0,82$  Па,  $W=800$  Вт).

Почти трехкратное увеличение давления при зажигании разряда свидетельствует не только о полной диссоциации  $C_4F_8$  в плазме, но и

дополнительном источнике радикалов в плазме. Медленный рост интенсивности излучения  $C_2$ ,  $C_3$  и  $CF_2$  радикалов говорит о том, что их источником радикалов являются стенки реактора. Радикалы образуются в результате распыления ФУП, осаждаемой на стенках. Увеличение концентрации радикалов до определенного стационарного значения происходит по мере покрытия стенок реактора ФУП. В течение этого времени изменяется ионный и радикальный состав плазмы.

Таблица 15 – Условия осаждения фторуглеродных пленок.

№ образца	Условия осаждения ФУП	F, ат.%	C, ат.%	F/C	$V_{ос}$ , нм/с
1	$C_4F_8$ плазма	57,0	43,0	1,33	5,0
2	$C_4F_8 + 10\%SF_6$ плазма	56,3	43,7	1,29	4,7
3	$C_4F_8$ , $W_{см} = 20$ Вт	55,3	44,7	1,24	4,5
4	$C_4F_8 + SF_6$ , $W_{см} = 20$ Вт	54,5	45,5	1,20	1,25

Вывод о наличии поверхностного источника CF и  $CF_2$  радикалов в плазме различных фторуглеродных газов был сделан во многих работах. Резкое возрастание интенсивности линии излучения при  $\lambda=257,4$  нм, которое можно отнести к излучению радикалов  $CF_2$ , свидетельствует об увеличении их концентрации. Падение интенсивности полос излучения  $C_2$  и  $C_3$  указывает на уменьшение содержания, по-видимому, тяжелых ненасыщенных радикалов  $C_xF_y$  ( $x>2, y>2x\pm 1$ ). Высокий и узкий пик ( $\lambda=516,5$  нм), соответствующий излучению  $C_2$ , по-видимому отражает содержание насыщенных  $C_xF_{2x+2}$  радикалов в плазме.

Постоянство скорости осаждения полимерной пленки при увеличивающихся во времени потоках радикалов на поверхность объясняется тем, что с увеличением давления уменьшается плотность ионного потока на подложку. Поскольку процесс осаждения ФУП является ионно-стимулированным, и скорость осаждения зависит как от потока ионов, так и потока радикалов, такое противоположное изменение потоков ионов и радикалов приводит к постоянству скорости осаждения ФУП.

Уменьшение концентрации фтора на поверхности ФУП при добавке  $SF_6$  в плазму можно объяснить тем, что при таких условиях атомы фтора быстро рекомбинируют на поверхности ФУП с образованием насыщенных летучих

продуктов. Вследствие этого концентрация активных центров на поверхности увеличивается и возрастает скорость полимеризации. Этот вывод подтверждается наблюдаемым увеличением скорости осаждения ФУП при небольших добавках  $SF_6$ .

Увеличение энергии бомбардирующих ионов влияет таким же образом, как и добавка фтора в плазму. Скорость осаждения при небольшом увеличении энергии ионов ( $E_i < 30$  эВ) увеличивается, а затем уменьшается. Наблюдаемое уменьшение фтора в приповерхностной области ФУП с подачей ВЧ смещения также можно объяснить тем, что ионная бомбардировка увеличивает поверхностную концентрацию активных центров роста ФУП. Это также ведет к увеличению скорости осаждения полимера.

Итак, небольшая добавка  $SF_6$  в плазму  $C_4F_8$  приводит к увеличению скорости осаждения ФУП. Спектральными измерениями обнаружено, что с увеличением  $SF_6$  (<40%) в смеси относительная концентрация  $CF_2$  и  $C_2$  радикалов в плазме возрастает. Методом РФЭС показано, что с ростом  $SF_6$  и ВЧ мощности смещения отношение F/C на поверхности пленки падает.

Таким образом, разработан способ установления влияния добавки гексафторида серы (0 – 40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок с точностью не хуже 0,1 нм/с, отношение концентраций F/C с точностью не хуже 0,1 % и соотношение химических связей C-F3, C-F2, C-F, C-CFn, C-C с точностью не хуже 1,0 % во фторуглеродных пленках.

### 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. Российская химия сквозь призму времени. Вестн. РАН. 2012. Т. 82. № 10. С. 938-948.
2. Золотов Ю.А. Лаборатория на микрочипе, на кране, в капилляре. Где еще? Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 9. С. 827.
3. Золотов Ю.А. Еще раз об аналитическом контроле объектов окружающей среды. Журн. аналит. химии. 2012 Т. 67. № 7. С. 675-676.
4. Золотов Ю.А. Обобщенные показатели качества воды. Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 11. С. 967.
5. Орешкин В.Н., Цизин Г.И. Атомно-абсорбционное определение элементов в природных объектах с применением тигля-испарителя с двумя зонами конденсации. Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 10. С. 925 – 928.
6. Борисова Д.Р., Статкус М.А., Цизин Г.И., Золотов Ю.А. Проточное сорбционно-жидкостно-хроматографическое определение фенолов, включающее концентрирование на углеродном сорбенте и десорбцию субкритической водой. Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. № 3. С. 224 – 231.
7. Fedyunina N.N, Ossipov K.B., Seregina I.F., Bolshov M.A., Statkus M.A, Tsysin G.I. Determination of rare earth elements in rock samples by inductively coupled plasma mass-spectrometry after sorption preconcentration using Pol-DEТАТА sorbent. Talanta. 2012. V. 86 . No. 1.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.026>
8. Терещенкова А.А., Статкус М.А., Тихомирова Т.И., Цизин Г.И. Новые сорбционные системы для концентрирования и определения редкоземельных элементов в растворах. В кн. Всероссийская научная школа по аналитической спектроскопии. Материалы научной школы. Издательство ООО «Альталюкс», Краснодар. 2012. ISBN 978-5-9903947-1-1. С. 266 – 270.
9. Федюнина Н.Н., Осипов К.Б., Статкус М.А., Серегина И.Ф., Цизин Г.И., Большов М.А. Влияние природы сорбента на обратимое концентрирование платиновых металлов с последующим определением методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. / В кн. Всероссийская научная школа по аналитической спектроскопии. Материалы научной

- школы. Издательство ООО «Альталюкс», Краснодар. 2012. ISBN 978-5-9903947-1-1. С. 271 – 280.
10. Цизин Г.И. Развитие методов концентрирования микрокомпонентов в России (1991–2010 гг.). / В кн. «Очерки российской аналитической химии». Авторы составители Ю.А. Золотов и В.К. Карандашев. Изд-во КУРС. Москва. 2012. ISBN 978-5-905554-21-6. С. 435 – 452.
  11. Елфимова Я.А., Пичугина Д.А., Ананьева И.А., Мажуга А.Г., Шпигун О.А. Закономерности удерживания аминопиридинов на силикагеле, модифицированном наночастицами золота // Журнал физической химии. 2012. Т. 86. №9. С. 1 – 8.
  12. Dmitrienko S.G., Аpyari V.V., Kudrinskaya V.A., Stepanova A.V. Preconcentration of flavonoids on polyurethane foam and their direct determination by diffuse reflectance spectroscopy. // Talanta. 2012. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.08.017.
  13. Kryvshenko G.A., Apel P.Yu., Abramchuk S.S., Beklemishev M.K. A highly permeable membrane for separation of quercetin obtained by nickel(II) ion-mediated molecular imprinting. // Sep. Sci. Technol. 2012. Vol. 47. No 12. P. 1715–1724.
  14. Шведене Н.В., Краснов С.А., Немилова М.Ю., Григорьева А.В., Сотнезова К.М., Плетнев И.В. Ионные жидкости с анионом N-лауроилсаркозината в мембранах ионселективного электрода. // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 10. С. 929 – 937.
  15. Shvedene N.V., Rzhavskaia A.V., Pletnev I.V. Ionic liquids based on quaternary phosphonium cation as active components of solid-state iodide selective electrode. Talanta, 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.057>.
  16. Золотухита Е.В.; Воротынцев М.А., Безверхий И.С., Борисова А.В., Карякин А.А.; Золотов Ю.А. Композитные материалы на основе наночастиц Берлинской Лазури и полипиррола для создания стабильного сенсора на пероксид водорода. // Докл. АН СССР, сер. Физической химии. 2012. Т. 444. № 1. С. 75 – 78.
  17. Voronin O.G., Shestakov A.I., Sadraddinova E.R., Abramov S.M., Netrusov A.I., Zorin N.A., Karyakin A.A. Bioconversion of the cellulose containing waste into

electricity through the intermediate hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy. 2012. V. 37. No 14. P. 10585 – 10589.

18. Sekretaryova A.N., Vokhmyanina D.V., Chulanova T.O., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Reagentless Biosensor Based on Glucose Oxidase Wired by the Mediator Freely Diffusing in Enzyme Containing Membrane. // Analytical Chemistry. 2012. V. 84. No 3. P. 1220 – 1223.
19. Dinarieva T.Y., Trashin S.A., Kahnt J., Karyakin A.A., Netrusov A.I. Purification and characterization of azurin from the methylamine-utilizing obligate methylotroph *Methylobacillus flagellatus* KT. // Canadian Journal of Microbiology. 2012. V. 58. No 4. P. 516 – 522.

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

1. Бендрышев Александр Александрович «Определение витаминов и коэнзимов Q9 и Q10 в объектах со сложной матрицей методом жидкостной хроматографии». Дата защиты – 31 октября 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. Самарина Татьяна Олеговна «Нитрозоафтолы в новых аналитических системах спектроскопического определения металлов». Дата защиты – 31 октября 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. Список молодых специалистов, принимавших участие в выполнении государственного контракта

№ п. п.	Фамилия Имя Отчество	Дата рождения	Должность	Ученая степень	Место работы
1	Статкус Михаил Александрович	22.06.1983	снс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

2	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 Валерьевна	14.05.1986	н.с.	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
5	Прохорова Александра Федоровна	01.04.1984	мнс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
6	Моногарова Оксана Викторовна	19.12.1982	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	Самарина Татьяна Олеговна	13.04.1984	инж		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
9	Удалова Алла Юрьевна	14.08.1988	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	10.09.1989	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	Борисова Дина Рашидовна	12.01.1990	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
14	Разважная Олеся Владимировна	11.10.1987	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
15	Ржевская Александра Вячеславовна	26.02.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
16	Буслова Татьяна Сергеевна	02.04.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
17	Мясникова Дина Андреевна	22.05.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

18	Федюнина Наталья Николаевна	30.10.1988	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
19	Елфимова Яна Андреевна	16.04.1987	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
20	Браун Аркадий Владимирович	06.10.1988	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
21	Кузнецова Ольга Игоревна	29.07.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
22	Соколова Лидия Сергеевна	18.11.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
23	Ставрианиди Андрей Николаевич	13.07.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
24	Архипова Виктория Владиславовна	09.08.1990	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
25	Костромских Анастасия Андреевна	26.09.1990	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
26	Терентьева Екатерина Александровна	06.01.1992	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
27	Дубенский Александр Сергеевич	31.01.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
28	Осипенко Сергей Владимирович	17.10.1991	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
29	Федорова Ирина Александровна	05.12.1989	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
30	Натчук Сергей Владимирович	31.10.1990	студент		
31	Толмачева Вероника Владимировна	30.06.1991	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
32	Паутова Алиса Константиновна	28.11.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
33	Панкова Татьяна Андреевна	28.04.1992	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
34	Назаренко Дмитрий	01.11.1991	студент		Химический факультет МГУ им.

	Владимирович				М.В.Ломоносова
35	Шаранов Павел Юрьевич	11.04.1992	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
36	Лазов Михаил Александрович	26.10.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

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

Разработаны четыре лабораторных образца химически модифицированных электродов для вольтамперометрического определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот, обеспечивающих определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  М (в ТЗ – не выше  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  М).

Разработан лабораторный образец сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии, обеспечивающий разделение смеси фторида, хлорида, нитрита, нитрата, фосфата и сульфата менее, чем за 20 мин (в ТЗ – менее 20 мин), с эффективностью не менее 20000 ТТ/м (в ТЗ – не менее 20000 ТТ/м). Размер частиц сорбента находится в пределах 3,5-5 мкм (в ТЗ – в пределах 3,5-5 мкм).

Разработана методика селективного определения отдельных групп антиоксидантов ((например, биофлавоноидов) в растительных экстрактах и пищевых продуктах, обеспечивающая определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-5}$  М (в ТЗ – не выше  $10^{-5}$  М).

Разработана методика полупрепаративного хроматофокусирования 8-10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием, обеспечивающая разрешение хроматографических пиков не менее 0,75-1,0 (в ТЗ – не менее 0,75-1,0).

Разработан способ установления влияния добавки гексафторида серы (0-40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок с точностью не хуже 0,1 нм/с (в ТЗ – не хуже 0,1 нм/с), отношение концентраций F/C с точностью не хуже 0,1 % (в ТЗ – не хуже 0,1 %) и соотношение химических

связей C-F3, C-F2, C-F, C-CFn, C-C с точностью не хуже 1,0 % (в ТЗ – не хуже 1,0 %) во фторуглеродных пленках.

### 3.5. 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	18
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	21
И.1.1.4	Количество исследователей – исполнителей НИР, результаты работы которых в рамках НИР опубликованы в высокорейтинговых российских и зарубежных журналах	чел.	63	65
И.1.1.5	Наличие документов, подтверждающих внедрение результатов работ в образовательный процесс	ДА/НЕТ	да	да
	<b>Наименование показателя</b>			
П.1.1.1	Количество докторов наук – исполнителей НИР, работающих в научной или образовательной организации на полную ставку,	чел.	8	12

	принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР			
П.1.1.2	Количество молодых кандидатов наук – исполнителей НИР, работающих в научной или образовательной организации на полную ставку, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР (как правило, соискателей ученой степени доктора наук)	чел.	6	7
П.1.1.3	Количество аспирантов, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	12	17
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	21,36
П.1.1.6	Доля фонда оплаты труда молодых участников НИР (молодых кандидатов наук, аспирантов и студентов) в общем объеме фонда оплаты труда по НИР	%	50	50,93

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

Разработанные методики селективного определения отдельных групп антиоксидантов ((например, биофлавоноидов) в растительных экстрактах и пищевых продуктах (раздел 2.3), полупрепаративного хроматофокусирования 8-10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием (раздел 2.4), способ установления влияния добавки гексафторида серы (0-40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок (раздел 2.5), а также химически модифицированные электроды для вольтамперометрического определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот (раздел 2.1) и сорбент для определения анионов методом ионной хроматографии, обеспечивающий разделение смеси фторида, хлорида, нитрита, нитрата, фосфата и сульфата (раздел 2.2), 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 заключительному этапу № 5 государственного контракта от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365 разработаны четыре лабораторных образца химически модифицированных электродов для вольтамперометрического определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  М; лабораторный образец сорбента для определения анионов методом

ионной хроматографии, обеспечивающий разделение смеси фторида, хлорида, нитрита, нитрата, фосфата и сульфата менее, чем за 20 мин, с эффективностью не менее 20000 ТТ/м и размером частиц в пределах 3,5-5 мкм; методика селективного определения отдельных групп антиоксидантов ((например, биофлавоноидов) в растительных экстрактах и пищевых продуктах, обеспечивающая определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-5}$  М; методика полупрепаративного хроматофокусирования 8-10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием, обеспечивающая разрешение хроматографических пиков не менее 0,75-1,0; способ установления влияния добавки гексафторида серы (0-40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок с точностью не хуже 0,1 нм/с, отношение концентраций F/C с точностью не хуже 0,1 % и соотношение химических связей C-F<sub>3</sub>, C-F<sub>2</sub>, C-F, C-CF<sub>n</sub>, C-C с точностью не хуже 1,0 % во фторуглеродных пленках.

В рамках выполнения работ по этапу защищены 2 кандидатские диссертации, опубликовано 19 статей в высокорейтинговых журналах.

Таким образом, в рамках выполнения государственного контракта от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365 разработаны лабораторные образцы новых наноструктурированных сорбентов для концентрирования пестицидов, биологически активных органических соединений, лабораторные образцы анионообменных сорбентов, а также сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии, лабораторные образцы ионселективных электродов на основе ионных жидкостей, а также химически модифицированных электродов. С использованием этих материалов и устройств должен быть разработан комплекс современных высокочувствительных методов химического анализа объектов окружающей среды, медицинской диагностики и материаловедения. В выполнении работ по проекту принимали участие не менее 6 молодых кандидатов наук на каждом этапе (всего 9 молодых кандидатов наук), не менее 12 аспирантов на каждом этапе (всего 32 аспиранта), не менее 10 студентов на каждом этапе (всего 24 студента), не менее 8 докторов наук на каждом этапе (всего 12 докторов наук). В рамках выполнения проекта защищены 4 докторских и 18 кандидатских

диссертаций, опубликовано 6 монографий, 2 учебника, 108 статей в высокорейтинговых журналах, получено 3 патента РФ.

Все работы выполнены на мировом уровне и в соответствии с требованиями Технического задания к контракту.

## 6. ЛИТЕРАТУРА

1. Cammarata L., Kazarian S.G., Salter P.A., Welton T. // *Phys.Chem.Chem.Phys.* – 2001. – V.3. – P. 5192 – 5200.
2. Koel M. // *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.* – 2000. – № 3. – P. 145 – 155.
3. Wilkes J.S., Levisky J.A., Wilson R.A. // *Inorg. Chem.* – 1982. – V. 21. – P. 1263 – 1264.
4. Zhao Y., Ye T., Liu H., Kou Y., Li M., Shao Y., Zhu Z., Zhuang Q. // *Frontiers in Bioscience.* – 2006. – V. 11. – P. 286 – 2982.
5. Liu Y., Shi L., Wang M., Li Z., Liu H., Li J. – *Green Chem.* – 2005. – № 7. – P. 655 – 658.
6. Chen H., Wang Y., Liu Y., Wang Y., Qi L., Dong S. // *Electrochemistry Communications.* – 2007. – V.9. – № 3. – P. 469 – 474.
7. Marcilla R., Sanchez-Paniagua M., Lopez-Ruiz B., Lopez-Cabarcos E., Ochoteco E., Grande H., Mecerreyes D. // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* – 2006. – V. 44. – № 13. – P. 3958 – 3965.
8. Zhao Q., Zhan D., Ma H., Zhang M., Zhao Y., Jing P., Zhu Z., Wan X., Shao Y., Zhuang Q. // *Frontiers in Bioscience.* – 2005. – № 10. – P. 326 – 34.
9. Liu Y., Liu L., Dong S. // *Electroanalysis.* – 2005. – V. 19. – № 1. – P. 55 – 59.
10. Yan Q., Zhao F., Li G., Zeng B. // *Electroanalysis.* – 2006. – V. 18. – № 11. – P. 1075 – 1080.
11. Zhao Y., Gao Y., Zhan D., Liu H., Zhao Q., Kou Y., Shao Y., Li M., Zhuang Q., Zhu Z. // *Talanta.* – 2005. – V. 66. – P. 51 – 57.
12. Liu H., He P., Li Z., Sun C., Shi L., Liu Y., Zhu G., Li J. // *Electrochemistry Communications.* – 2005. – V. 7. – № 12. – P.1357 – 1363.
13. Maleki N., Safavi A., Tajabadi F. // *Anal. Chem.* – 2006. – V. 78. – P. 3820 – 3826.
14. Safavi A., Maleki N., Moradlou O., Tajabadi F. // *Analytical Biochemistry.* – 2006. – V. 359. – P. 224 – 229.
15. Safavi A., Maleki N., Tajabadi F. // *Analyst.* – 2007. – V. 132. – P. 54 – 58.
16. Li J., Zhao F., Zeng B. // *Microchimica Acta.* – 2007. – V. 157. – № 1 – 2. – P. 27 – 33.

17. Иванов В.А., Горшков В.И. 70 лет истории производства ионообменных смол. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2006. – Т.6. – Вып. 1. – С. 5 – 31.
18. Боголицына А.К., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Синтез анионообменников на основе сополимера стирола и дивинилбензола. // Изв. вузов Сев.-Кавк. региона. Естеств. науки. Приложение. – 2006. – № 8. – С. 24 – 30.
19. Боголицына А.К., Пирогов А.В., Шпигун О.А., Бухбергер В. Синтез и изучение ионохроматографических свойств новых анионообменников с конформационно-подвижными функциональными группами. // Сорбцион. и хроматогр. процессы. – 2006. – Т.6. – №5. – С. 827 – 832.
20. Grimm A., Seubert A. Influence of modifier-free hydroxide eluents on the separation of carbohydrates by anion exchange chromatography. // *Microchim. Acta.* – 2004. – V. 146. – P. 97 – 102.
21. Sarzanini C. Recent developments in ion chromatography. // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – V. 956. – P. 3 – 13.
22. Пирогов А.В., Чернова М.В., Немцева Д.С., Шпигун О.А. Влияние сульфорирующего реагента на методику синтеза и ионохроматографические свойства сульфированных стирол-дивинилбензольных сорбентов высокой степени сшивки. // *Вест. Моск. унив-та. Сер. 2. Химия.* – 2002. – Т. 43. – № 3. – С. 172 – 177.
23. Боголицына А.К., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Синтез матрицы сорбентов для ионной хроматографии на основе стирола и дивинилбензола. // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2. Химия.* – 2006. – Т. 47. – № 5. – С. 339 – 341.
24. Pirogov A.V., Chernova M.V., Nemtseva D.S., Shpigun O.A. Sulfonated and sulfoacylated poly(styrene-divinylbenzene) copolymers with different degree of cross-linking as matrices for cation and anion chromatography. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – V. 376. – No. 5. – P. 745 – 752.
25. Антоник Л.М., Лопырев В.А., Тиунов М.П., Долгушин Г.В. Кватернизация 1,1-диметилгидразина хлорметилированным полистиролом и свойства полученных анионообменных смол. // *Журнал прикладной химии.* – 2000. – Т. 73. – Вып. 11. – С. 1759 – 1762.

26. Xu H., Hu X. Preparation of anion exchangers by reductive amination of acetylated crosslinked polystyrene. // *Reactive and Functional Polymers*. – 1999. – V. 42. – P. 235 – 242.
27. Kulin L.-I., Flodin P. Monosized polymer particles in size-exclusion chromatography. // *J. Chromatogr.* – 1990. – V. 514. – P. 1 – 9.
28. Fussler R., Schafer H., Seubert A. Effect of the porosity of PS-DVB-copolymers on ion chromatographic behavior in inverse size-exclusion and ion chromatography. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – V. 372. – P. 705 – 711.
29. Li J., Fritz J.S. Novel polymeric resins for anion-exchange chromatography. // *J. Chromatogr. A*. – 1998. – V. 793. – P. 231 – 238.
30. Kitahara K., Hirai Y., Toshihama I., Hanada T., Nagashima K., Arai S., Yamashita Y. Preparation of monodispersed porous polymer resins and their application to stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates. // *Anal. Sci.* – 2001. – V. 17. – P. 1225 – 1228.
31. Barron R.E., Fritz J.S. Effect of functional group structure on the selectivity of low-capacity anion exchangers for monovalent anions. // *J. Chromatogr.* – 1984. – V. 284. – P. 13 – 25.
32. Vlacil F., Vins I. Modified hydroxyethyl methacrylate copolymers as sorbents for ion chromatography. II. Influence of the functional group on sorbent selectivity. // *J. Chromatogr.* – 1987. – V. 391. – P. 133 – 135.
33. Касьянова Т.Н., Смоленков А.Д., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Синтез и сравнение хроматографических свойств полимерных анионообменников с диметилгидразиниевыми и алкиламмониевыми функциональными группами. // *Журн. аналит. химии*. – 2008. – Т. 63. – № 1. С. 27 – 32.
34. Pohl C.A., Saini C. Coated ion-exchanged substrate and method of forming. // *US Patent*. No. 7291395. – 2007.
35. Buszevski B., Jackowska M., Bocain S., Kosobucki P., Gawdzik B. Functionalized polymeric stationary phases for ion chromatography. // *J. Sep. Sci.* – 2011. – V. 34. – P. 601 – 608.
36. Bauman W.C., Kellar R. Anion-exchange resin. U.S. 2614099 (1952). // *Chem. Abstr.* – 1953. – V. 47. P. 2401.

37. Laskin S., Drew R.T., Cappiello V. Inhalation carcinogenicity of alpha halo ethers. II. Chronic inhalation studies with chloromethyl methyl ether. // Arch. Environ. Health. – 1975. – V. 30. – P. 70 – 72.
38. Schminke G., Seubert A. Simultaneous determination of inorganic disinfection by-products and seven standart anions by ion chromatography. // J. Chromatogr. A. – 2000. – V. 890. – P. 295 – 301.
39. Былина Г.С., Николаева Т.А. Синтез линейного поли(п-хлорметил)стирола хлорметилированием полистирола смесью метилаля и хлористого тионила. // Высокмолек. соед. Серия Б. – 1997. – Т. 39. № 8. – С. 1392–1395.
40. Ford W.T., Yacoub A. A carbon-13 NMR method to determine the origin of crosslinked chloromethyl polystyrenes used in polymer-supported synthesis. // J. Org. Chem. – 1981. – V. 46. – P. 819 – 821.
41. Warth L.M., Fritz J.S. Effect of length of alkyl linkage on selectivity of anion-exchange resins. // J. Chromatogr. Sci. – 1988. – V. 26. – P. 630 – 635.
42. Biesaga M., Schmidt N., Seubert A. Coupled ion chromatography for the determination of chloride, phosphate and sulphate in concentrated nitric acid. // J. Chromatogr. A. – 2004. – V. 1026. – P. 195 – 200.
43. Schmidt N., Biesaga M., Seubert A. Trace anion determination in concentrated nitric acid by means of two coupled ion chromatography systems. // Microchim. Acta. – 2004. – V. 146. – P. 119 – 128.
44. Nowak M., Seubert A. Application of experimental design for the characterisation of a novel elution system for high-capacity anion chromatography with suppressed conductivity detection. // J. Chromatogr. A. – 1999. – V. 855. – P. 91 – 109.
45. Nowak M., Seubert A. Spacer-modified stationary phases for anion chromatography: Alkyl- and carbonylalkylspacers - A comparison. // Fresenius J. Anal. Chem. – 2000. – V. 366. – P. 341 – 345.
46. Касьянова Т.Н., Смоленков А.Д., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Влияние ацилирующего агента на селективность анионообменников и эффективность разделения. // Вестн. Моск. ун-та. Сер.2. Химия. – 2007. – Т.48. – № 5. – С. 347 – 351.

47. Xu H., Hu X. A novel way to prepare anion exchangers based on crosslinked polystyrene. // *Polym. Bulletin.* – 1998. – V. 40. P. 47 – 53.
48. Childs R.E., Bardsley W.G. // *Biochem. J.* – 1975. – No 145. – P. 93 – 103.
49. Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F.A. // *J. Sci. Food Agric.* – 1998. – No 76. – P. 270 – 276.
50. Miller N. J., Rice-Evans C. A., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A. // *Clin. Sci.* – 1993. – No 84. – P. 407 – 412.
51. Gorinstein S., Caspi A., Libman I., Leontowicz H., Leontowicz, M., Tashma Z., Katrich E., Jastrzebski, Z., Trakhtenberg, S. // *Intern. J. Food Sci. Nutr.* – 2007. – No 58. – P. 94 – 107.
52. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. // *Free Rad. Biol. Med.* – 1999. – No 26. – P. 1231 – 1237.
53. Wang C.C., Chu C.Y., Chy K.O., Choy K.W., Khaw K.S., Rogers M.S., Pang C.P. // *Clin. Chem.* – 2004. – No 50. – P. 952 – 954.
54. Singleton V.L., Rossi J.A. // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1965. – No 16. – P. 144 – 158.
55. Benzie I.F.F., Strain J.J. // *Anal. Biochem.* – 1996. – No 239. – P. 70 – 76.
56. Cao G.H., Alessio H.M., Cutler R.G. // *Free Rad. Biol. Med.* – 1993. – V. 3. – No 14. – P. 303 – 311.
57. Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K. // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – No 50. – P. 3122 – 3128.
58. Fan P.M., Wang B. // *Acta Chim. Sinica.* – 2010. – V. 68. – P. 2543.
59. Shan J., Wang B. // *Sep. Sci. Technol.* – 2011. – V. 46. – P. 164.
60. Кудринская В.А., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. // *Вестник МГУ. Сер. 2. Химия.* – 2009. – Т. 50. – № 3. С. – 156 – 163.
61. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. П/ред. А.Хеншен, К.-П.Хупе, Ф.Лотшпайха, В.Вельтера. М.: Мир. – 1988. – 688 с.
62. Croft L.R. Handbook of protein sequence analysis: a compilation of amino acid sequences of proteins with an introduction to the methodology. New York: Wiley. – 1980. – 628 pp.



63. Malmqvist G., Lundell N. Characterization of the influence of displacing salts on retention in gradient elution ion-exchange chromatography of proteins and peptides // *J. Chromatogr. A.* – 1992. – V. 627. – P. 107 – 124.
64. Yang Y-B., Harrison K., Kindsvater J. Characterization of a novel stationary phase derived from a hydrophilic polystyrene-based resin for protein cation-exchange high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 1996. – V. 723. – P. 1 – 10.
65. Barnidge D.R., Tschumper R.C., Jelinek D.F., Muddiman D.C., Kay N.E. Protein expression profiling of CLL B cells using replicate off-line strong cation exchange chromatography and LC-MS/MS. // *J. Chromatogr. B.* – 2005. – V. 819. – P. 33 – 39.
66. Bihan T.L., Duewel H.S., Figeys D. On-line strong cation exchange  $\mu$ -HPLC-ESI-MS/MS for protein identification and process optimization // *J. Am. Soc. Mass Spectr.* – 2003. – V. 14. – P. 719 – 727.
67. Granger M., Todorov S.D., Matthew M.K., Dicks L.M. Growth of *Enterococcus mundtii* ST15 in medium filtrate and purification of bacteriocin ST15 by cation-exchange chromatography. // *J Basic Microbiol.* – 2005. – V. 45. – P. 419 – 25.
68. Mirzaei H., Regnier F. Enrichment of carbonylated peptides using Girard P reagent and strong cation exchange chromatography. // *Anal. Chem.* – 2006. – V.78. – P. 770 – 778.
69. Strauss D.M., Lute S., Tebaykina Z., Frey D.D., Ho C., Blank S.G., Bronson K., Chen Q., Yang B. Understanding the mechanism of virus removal by Q-sepharose fast flow chromatography during the purification of CHO-cell derived biotherapeutics. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – V. 104. – P. 371 – 380.
70. Kang X., Frey D.D. Chromatofocusing of peptides and proteins using linear pH gradients formed on strong ion-exchange adsorbents. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2004. – V. 87. – P. 376 – 387.
71. Frey D.D., Kang X. New concepts in the chromatography of peptides and proteins. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2005. – V. 16. – P. 552 – 560.
72. *Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing: Principles and Methods.* Uppsala: Amersham Biosciences. – 2004. – P. 126 – 165.

73. Frey D.D., Narahari C.R., Bates R.C. Chromatofocusing. / In book: "Encyclopedia of Life Sciences". McMillan Publishe. – 2001. – P. 120 – 126.
74. Solo-Pérez J., Frey D.D. Behavior of the inadvertant pH transient formed by a salt gradient in the ion-exchange chromatography of proteins. // Biotechnol. Progr. – 2005. – V. 21. – P. 902 – 910.
75. Vakstein M.S., Nesterenko P.N., Ivanov A.V., Tessman A.B. Single-component eluents for quasi-linear pH gradients in weak cation exchange columns. // J. Liq. Chrom. & Related Techn. – 2006. – V. 29. – №4. – P. 485 – 489.
76. Rangelov I.W. // J. Vac. Sci. Technol. – 2003. – V. A21. – P. 1550 – 1557.
77. Laermer F., Urban A. // Microelectronic Engineering. – 2003. – V. 67. – P. 349 – 354.
78. Амиров И.И., Алов Н.В. // Химия высоких энергий. – 2006. – Т. 40. – № 4. – С. 1 – 6.
79. Амиров И.И., Алов Н.В. // Химия высоких энергий. – 2008. – Т. 42. – № 2. – С. 164 – 168.
80. Ясуда Х. Полимеризация в плазме. М.: Мир. – 1988. – 376 с.
81. Dussart R., Mellhaoui X., Lefauchaux P., Volatier M., Socquet-Clere, Braut P., Ranson P. // J. Phys. D: Appl. Phys. – 2005. – V. 38. – P. 3395 – 3402.
82. Gharghi M., Sivoththaman S. // J.Vac. Sci. Technol. – 2006. – V. A24. – P. 723 – 727.
83. Stubenrauch M., Fischer M., Kremin C., Stoebenau S., Albrecht A, Nagel O. // J. Micromech. Microeng. – 2006. – V. 16. – P. 82 – 87.
84. Laballe C.B., Donnelly V.M., Bogart G.R., Opila R.L., Kornblit A. // J. Vac. Sci. Technol. – 2006. – V. A22. – P. 2500 – 2507.
85. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. // Free Rad. Biol. Med. – 1999. – No 26. – P. 1231 – 1237.
86. Wang C.C., Chu C.Y., Chy K.O., Choy K.W., Khaw K.S., Rogers M.S., Pang C.P. // Clin. Chem. – 2004. – No 50. – P. 952 – 954.
87. Gomez-Ruiz J.A., Leake D.S., Ames J.M. // J. Agric. Food Chem. – 2007. – V. 22. – No 17. – P. 6963 – 6971.
88. Apak R., Guclu K. // Molecules. – 2007. – No 12. – P. 1496 – 1547.
89. Bartosz G. // Adv. Clin. Chem. – 2003. – V. 37. – P. 219 – 292.

## 7. ПРИЛОЖЕНИЯ

**УТВЕРЖДАЮ**  
Зам. декана химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.А.Бучаченко  
25 октября 2012 г.

**АКТ № 1**  
разработки лабораторных образцов  
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 четыре лабораторных образца химически модифицированных электродов для вольтамперометрического определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот, обеспечивающих определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  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 октября 2012 г.

**АКТ № 2**

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

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий научный сотрудник кафедры аналитической химии Смоленков Александр Дмитриевич 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 лабораторный образец сорбента для определения анионов методом ионной хроматографии, обеспечивающий разделение смеси фторида, хлорида, нитрита, нитрата, фосфата и сульфата менее, чем за 20 мин, с эффективностью не менее 20000 ТТ/м. Размер частиц сорбента находится в пределах 3,5-5 мкм.

Ведущий научный сотрудник

\_\_\_\_\_ А.Д. Смоленков

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А. Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**  
Зам. декана химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.А.Бучаченко  
20 октября 2012 г.

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

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий научный сотрудник кафедры аналитической химии Беклемишев Михаил Константинович 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 селективного определения отдельных групп антиоксидантов ((например, биофлавоноидов) в растительных экстрактах и пищевых продуктах, обеспечивающая определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-5}$  М

Ведущий научный сотрудник \_\_\_\_\_ М.К. Беклемишев

Заведующий кафедрой  
аналитической химии \_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**  
Зам. декана химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.А.Бучаченко  
20 октября 2012 г.

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

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

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0365 разработана методика полупрепаративного хроматофокусирования 8-10 олигопептидов на сульфокатионитах с последующим УФ-детектированием, обеспечивающая разрешение хроматографических пиков не менее 0,75-1,0.

Доцент \_\_\_\_\_ А.В. Иванов

Заведующий кафедрой  
аналитической химии \_\_\_\_\_ Ю.А. Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**

Зам. декана химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.А.Бучаченко  
20 октября 2012 г.

**АКТ № 5**  
разработки способа  
в рамках работ по государственному контракту  
от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий научный сотрудник кафедры аналитической химии Алов Николай Викторович 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 установления влияния добавки гексафторида серы (0-40 %) в плазме высокочастотного индукционного разряда перфторциклобутана и энергии бомбардирующих ионов на скорость осаждения фторуглеродных пленок с точностью не хуже 0,1 нм/с, отношение концентраций F/C с точностью не хуже 0,1 % и соотношение химических связей C-F<sub>3</sub>, C-F<sub>2</sub>, C-F, C-CF<sub>n</sub>, C-C с точностью не хуже 1,0 % во фторуглеродных пленках.

Ведущий научный сотрудник \_\_\_\_\_ Н.В. Алов

Заведующий кафедрой  
аналитической химии \_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов