

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

УДК 543

№ госрегистрации 01201064162

Инв.№ 0365-3

УТВЕРЖДАЮ

Зам. декана по научной работе

д-р хим. наук, профессор

\_\_\_\_\_ А.В. Анисимов

« » 2011 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

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

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

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

Наименование этапа: «Разработка новых способов и устройств (в том числе на основе ионных жидкостей и биосенсоров) для определения содержания катехоламинов, токсичных компонентов ракетного топлива и других физиологически активных веществ»  
(промежуточный, этап № 3)

Руководитель НИР  
заведующий кафедрой аналитической химии  
академик РАН

Ю.А.Золотов

Москва 2011

## Список

исполнителей по государственному контракту № 14.740.11.0365

в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические

кадры инновационной России»:

Руководитель темы, докт. хим. наук, академик РАН	_____	Золотов Юрий Александрович, зав. кафедрой	(Введение, заклучение, раздел 2.1)
Исполнители:	_____	Дмитриенко Станислава	(разделы
проф.	_____	Григорьевна	1.1.2, 2.1, 2.3)
проф.	_____	Моросанова Елена	разделы
	_____	Игоревна	(1.1.1. и 2.2)
в.н.с.	_____	Цизин Григорий Ильич	(разделы, 2.4 и 2.5)
	_____	Тихомирова Татьяна	(разделы
с.н.с.	_____	Ивановна	1.1.4. и 2.2)
	_____	Плетнев Игорь	разделы
в.н.с.	_____	Владимирович	(1.1.1. и 2.2)
	_____	Ревельский Игорь	(разделы
в.н.с.	_____	Александрович	1.1.2. и 2.6)
	_____	Ревельский Александр	(разделы
в.н.с.	_____	Игоревич	1.1.2. и 2.6)
	_____	Карякин Аркадий	(разделы
проф.	_____	Аркадьевич	1.1.2. и 2.3)
	_____	Беклемишев Михаил	(разделы
в.н.с.	_____	Константинович	1.1.4. и 2.7)
	_____	Алов Николай Викторович	(разделы
в.н.с.	_____		1.1.4. и 2.7)
	_____	Шпигун Олег Алексеевич	(разделы
проф.	_____		1.1.3. и 2.6)
	_____	Иванов Александр	(разделы
доц.	_____	Вадимович	1.1.3. и 2.6)
	_____	Ананьева Ирина	(разделы
с.н.с.	_____	Алексеевна	1.1.3. и 2.6)
	_____	Пирогов Андрей	(разделы
в.н.с.	_____	Владимирович	1.1.3. и 2.6)
	_____	Смоленков Александр	(разделы
в.н.с.	_____	Дмитриевич	1.1.3. и 2.6)
	_____	Статкус Михаил	(разделы
с.н.с.	_____	Александрович	1.1.2, 2.4)
	_____	Апяри Владимир	(разделы
н.с.	_____	Владимирович	1.1.2, 2.4)
	_____	Родин Игорь	разделы
н.с.	_____	Александрович	(1.1.3. и 2.6)
	_____	Ланская Светлана	(разделы
ст. преп.	_____	Юрьевна	1.1.1. и 2.2)
	_____	Прохорова Александра	(разделы
м.н.с.	_____	Федоровна	1.1.3. и 2.6)
	_____	Воронин Олег	(разделы
н.с.	_____	Геннадьевич	1.1.2. и 2.3)

м.н.с.		Борисова Анастасия Владимировна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Андреева Елена Юрьевна,	(раздел 2.7)
асп.		Затираха Александра Валерьевна	(разделы 1.1.3. и 2.6)
асп.		Буслова Татьяна Сергеевна	(разделы 2.2)
асп.		Мясникова Дина Андреевна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
асп.		Ставрианиди Андрей Николаевич	(разделы 1.1.3. и 2.6)
асп.		Голубева Александра Владимировна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Бурмыкин Дмитрий Александрович	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Самохин Андрей Сергеевич	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Федюнина Наталья Николаевна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
асп.		Сохраняева Александра Сергеевна	(разделы 1.1.2. и 2.2)
асп.		Терещенкова Анна Александровна	(разделы 1.1.2. и 2.2)
асп.		Смирнов Роман Сергеевич	(раздел 2.6)
асп.		Соколова Лидия Сергеевна	(разделы 1.1.4. и 2.6)
асп.		Браун Аркадий Владимирович	(разделы 1.1.4. и 2.7)
студ.		Борисова Дина Рашидовна,	(разделы 1.1.4. и 2.7)
студ.		Дубенский Александр Сергеевич	(разделы 1.1.4. и 2.7)
студ.		Назаренко Дмитрий Владимирович	(разделы 1.1.3. и 2.6)
студ.		Костромских Анастасия Андреевна	разделы (1.1.3. и 2.6)
студ.		Архипова Виктория Владиславовна	(разделы 1.1.4. и 2.7)
студ.		Атнагулов Айдар Газинурович	(разделы 1.1.4. и 2.7)
студ.		Толмачева Вероника Владимировна	(разделы 1.1.4. и 2.7)
студ.		Бескоровайный Александр Васильевич	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Копицын Дмитрий Сергеевич	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Коваленко Анастасия Андреевна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
студ.		Кагазежева Зухра Галиевна	(раздел 2.2.)
нормоконтролер		Барбалат Юрий Александрович	

## РЕФЕРАТ

Отчет 145 с., 53 рис., 19 табл., 121 источник.

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

Этап № 3. Разработка новых способов и устройств (в том числе на основе ионных жидкостей и биосенсоров) для определения содержания катехоламинов, токсичных компонентов ракетного топлива и других физиологически активных веществ.

Ключевые слова: ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ, БИОСЕНСОРЫ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА.

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

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

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

Синтезированы 4 лабораторных образца ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения не ниже  $10^{-5}$  М, время отклика электродов не более 1 мин, эксплуатационный ресурс – не менее 3 – 6 месяцев.

Разработаны 2 лабораторных образца биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе биоэлектродокатализа ферментами гидрогеназами, обеспечивающие определение водорода с чувствительностью  $3 \text{ А} \times \text{М}^{-1} \times \text{см}^{-2}$  и пределом обнаружения  $3 \times 10^{-8}$  М.

Разработана методика определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии, обеспечивающая определение целевого компонента при содержании в интервале не выше 5 и не ниже 1000 нг/л с относительной погрешностью не выше 40 %.

Разработана методика определения антибиотика группы пенициллинов (бензилпенициллина) в молоке с пределом обнаружения  $1 \times 10^{-7}$  М и методика определения 1-нафтиламина в сыворотке крови с пределом обнаружения  $4,5 \times 10^{-8}$  М.

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 защищено 2 кандидатских диссертации, опубликованы монография и 25 статей в высокорейтинговых журналах, разработаны научно-методические материалы к учебным курсам и программа внедрения результатов НИР в образовательный процесс.

## СОДЕРЖАНИЕ

	Страница
1. ВВЕДЕНИЕ	7
1.1. Оценка современного состояния решаемой проблемы (Разработка новых способов и устройств (в том числе на основе ионных жидкостей и биосенсоров) для определения содержания катехоламинов, токсичных компонентов ракетного топлива и других физиологически активных веществ)	7
1.1.1. Разработка лабораторных образцов ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот	7
1.1.2. Разработка лабораторных образцов биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе бозлектрокатализа ферментами гидрогеназами	13
1.1.3. Разработка методики определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии	18
1.1.4. Разработка методики определения пенициллиновых антибиотиков в пищевых продуктах, методики определения 1-нафтиламина в биологических жидкостях	24
1.1.5. Выводы к обзору литературы	28
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	29
2.1. Выбор направления исследований, методы решения задач	29
2.2. Разработка лабораторных образцов ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот	38
2.3. Разработка лабораторных образцов биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе бозлектрокатализа ферментами гидрогеназами	50
2.4. Разработка научно-методических материалов к учебным	71

курсам	
2.5. Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс	76
2.6. Разработка методики определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии	77
2.7. Разработка методики определения пенициллиновых антибиотиков в пищевых продуктах, методики определения 1-нафтиламина в биологических жидкостях	99
3. СТАТИСТИЧЕСКИЕ И ФАКТОГРАФИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ О НАУКОМЕТРИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТАХ ВЫПОЛНЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОГО КОНТРАКТА	120
3.1. Монографии, опубликованные по результатам выполнения государственного контракта	120
3.2. Статьи, опубликованные по результатам выполнения государственного контракта	121
3.3 Кандидатские диссертации, защищенные по результатам выполнения государственного контракта	123
3.4. Список молодых специалистов, принимавших участие в выполнении государственного контракта	124
3.5. Сравнение полученных результатов с техническими характеристиками, заявленными в Техническом задании государственного контракта	126
3.6. Индикаторы и показатели	127
4. ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЫНОЧНОГО ПОТЕНЦИАЛА РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ НИР	128
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
6. ЛИТЕРАТУРА	131
7. ПРИЛОЖЕНИЯ	141
7.1. Акты изготовления лабораторных образцов и методик	142

## 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 ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для 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.

В последнее десятилетие отмечен возрастающий интерес к данному классу веществ, чаще появляются публикации, посвящённые использованию ИЖ в органическом синтезе, катализе, электрохимии, при разработке новых композиционных материалов. В то же время примеры использования ИЖ в аналитической химии, особенно при создании электрохимических сенсоров, пока сравнительно немногочисленны.

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

Гидрофобность ИЖ, в основном, определяется анионом. Если в состав ИЖ входят гидрофильные анионы, то ИЖ могут смешиваться с водой в любых соотношениях, при этом наблюдается зависимость физических свойств ИЖ от количества воды, содержащейся в ИЖ. С другой стороны, такие анионы, как  $\text{PF}_6^-$  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 [3], 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  $\text{Tf}_2\text{N}^-$  на  $(\text{CF}_3\text{CF}_2)_3\text{PF}_3^-$  при сохранении такого же катиона  $\text{C}_1\text{C}_6\text{Im}^+$  приводит к понижению растворимости более чем в 20 раз.

Под электрохимическим «окном» принято понимать разницу между предельным анодным и катодным потенциалами окислительно-восстановительного



процесса фонового электролита [4]. Данное свойство характеризует электрохимическую устойчивость катиона и аниона ИЖ, что, в свою очередь, определяет диапазон потенциалов, доступных для электрохимических измерений. Очевидно, что чем шире электрохимическое “окно”, тем универсальнее ИЖ. Основное влияние на электрохимическое “окно” оказывает природа составляющих ионов. Также на значения предельных потенциалов влияют материал индикаторного электрода, условия измерения и чистота ионной жидкости.

Ионные жидкости могут играть роль пластификаторов для полимеров, тем самым улучшая их свойства: повышается термическую стабильность, снижается температуры стеклования. Известно, что ИЖ на основе катиона имидазолия отлично пластифицируют полиметилметакрилат (ПММА). При этом по сравнению с традиционными пластификаторами наблюдается более высокая термическая стабильность, температура стеклования снижается до 0<sup>0</sup>С, низкая летучесть, и как следствие, продлевается срок эксплуатации материала [5]. Установлены пластифицирующие свойства для ИЖ на основе катиона четвертичного фосфония  $(C_{12}H_{25})(C_2H_5)(C_6H_5)_2P^+Tf_2N^-$  по отношению к поливинилхлориду и полиметилметакрилату [6]. По физическим характеристикам полимеры, пластифицированные ионными жидкостями, сопоставимы с полимерами, пластифицированными традиционными пластификаторами (например, диоктилфталатом), но следует отметить гораздо более высокую термическую стабильность таких материалов.

Можно выделить следующие направления использования ИЖ в электроанализе:

- в качестве органических электролитов, в том числе и для изучения электрохимических процессов, реализовать которые в обычных растворителях затруднительно;

- при разработке композиционных материалов, для создания электрохимических сенсоров (токопроводящие полимеры, полупроницаемые мембраны, проводящие гели и т.д.);

- для модифицирования электродов ионными жидкостями или материалами на их основе.

В последнее время появляется все больше публикаций по применению ионных жидкостей в вольтамперометрии благодаря целому ряду ценных свойств. В одной из ранних работ [7] электропревращения редокс-пары  $Fa(CM)_6^{3-} / Fa(CM)_6^{4-}$  были осуществлены в среде 1-метил-3-[2,6-(S)-диметилоктени-2-ил]имидазолия тетрафторбората для изучения перераспределения гидрофильных ионов между водой и ионной жидкостью. Было найдено, что распределение зависит от типа иона, силы его взаимодействия с ионной жидкостью и концентрацией фонового электролита.

В настоящее время проводятся исследования по использованию ИЖ в аналитических методах в качестве сред для изучения сложных электрохимических процессов. В литературе описан метод циклической вольтамперометрии на графитовом электроде для определения бис-фталоцианина лютеция в среде ионной жидкости [8]. Бромид тетраоктилфосфония использовался в качестве органического электролита. Показано, что восстановление бис-фталоцианина лютеция сопровождается образованием ионных пар между восстановленной формой фталоцианина Lu(III) и катиона ИЖ, и окислительных форм Lu(III) фталоцианина с анионом галогенида. В результате подобных ассоциаций повышается реакционная способность частиц, а также исключаются возможности взаимодействия с водой.

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

Первая работа с описанием композита на основе ИЖ и углеродных нанотрубок появилась в 2003 году [9]. Сейчас количество работ по данной тематике существенно возросло. В литературе предлагаются гели на основе ИЖ и нанотрубок в качестве модификаторов электродов. Например, электрохимический датчик на основе  $PbO_2$ , углеродных нанотрубок и ИЖ 1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфата был разработан для одновременного определения гуанина и аденина [10]. При дифференциально-импульсной вольтамперометрии с использованием данного электрода значительно увеличились максимальные токи окисления по сравнению с обычным угольным электродом. Также значительно улучшилась чувствительность определения гуанина и аденина.

Сочетание «ионные жидкости–углеродные нанотрубки» – многообещающее направление разработки простых и чувствительных вольтамперометрических сенсоров. Использование модифицирующих композиций на основе ионных жидкостей и иных углеродных материалов также представляет значительный интерес. Так, ионные жидкости могут служить в качестве токопроводящих связующих графитовых паст. На основе подобных композиций сконструирован угольно-пастовый электрод, содержащий полиоксомолибдат в качестве катализатора восстановления нитрита [11]. В работе [12] отмечаются преимущества угольно-пастовых электродов на основе 1-Bu-3-MeImPF<sub>6</sub> и 1-октил-3-MeImPF<sub>6</sub> в качестве связующих, альтернативных обычно используемым (например, парафину), для вольтамперометрического определения различных электроактивных соединений. Показана применимость графитовых паст на основе ионных жидкостей для создания электродов, пригодных для вольтамперометрического определения микромолярных содержаний допамина, мочевиной и аскорбиновой кислот в моче [13], а также для количественного определения фенольных соединений [14]. В работе [15] использовали графитовые пасты на основе 1-Bu-3-MeIm для модифицирования Au-электрода и количественного определения прометазина вплоть до концентраций  $n \cdot 10^{-8}$  М.

Способность ионных жидкостей к каталитической активности успешно используются при создании биосенсоров. В работе [16] авторы 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. Отмечается высокая стабильность фермента, иммобилизованного таким способом. На основе данного композиционного материала был сконструирован амперометрический биосенсор, характеристики которого изучались методами циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии. Авторы подчеркивают возможность использования предложенного ими биосенсора для определения в потоке.

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

Была показана возможность применения ионной жидкости в ионометрии. Гексафторфосфат 1-бутил-3-метилимидазолия использовался в качестве

ионногенной добавки пластифицированной мембраны ПВХ-электрода на сульфат-ион, улучшающей диэлектрическую проводимость.

В работах, выполняемых в нашей научной группе, ионные жидкости использовались в качестве электродноактивных компонентов [6, 17, 18] мембран жидкостной и твердотельной конструкции. В работе [6] предложили использовать ИЖ  $\text{BMIm}^+\text{PF}_6^-$ ,  $\text{BDMIm}^+\text{Tf}_2\text{N}^-$  и додецилдифенилэтлфосфония бистрифлиламид  $\text{DEDPP}^+\text{Tf}_2\text{N}^-$  в качестве компонентов пластифицированных полимерных мембран ИСЭ с жидкостным заполнением. Изучено 18 различных комбинаций ИЖ и полимеров. Показано, что многие сенсоры на основе ИЖ обладают широким интервалом рН-функционирования, хорошей воспроизводимостью, малым временем отклика (менее 20 с). Мембрана на основе  $\text{BDMIm}^+\text{Tf}_2\text{N}^-$  - ПММА демонстрировала чувствительность к катионным ПАВ. Так в растворах хлорида цетилпиридиния был получен близкий к теоретическому катионный отклик ( $56 \pm 3$  мВ/рС). Мембрана  $\text{DEDPP}^+\text{Tf}_2\text{N}^-$  - ПВХ демонстрирует близкий к нернстовскому отклик и к катионам, и к анионам с поверхностно-активными свойствами.

В работе [17] исследовали ИЖ с катионами замещенных имидазолия, пиридиния, пирролидиния и гидрофобными фторсодержащими анионами в качестве электродноактивных компонентов пластифицированных мембран ИСЭ на катионные ПАВ. Предложенные ИСЭ проявляют потенциометрический отклик к катионам бензиламмония, тетрадецилтриметиламмония, цетилтриметиламмония, при этом крутизна электродной функции близка к теоретической, предел обнаружения не выше  $n \cdot 10^{-6}$  М. Разработанный электрод на анионы на основе ИЖ – салицилат триоктилметиламмония – проявил потенциометрический отклик к салицилат-иону в широком диапазоне концентраций. Селективность по отношению к салицилату соответствует ряду липофильности анионов Гофмейстера.

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

- миниатюрность конструкции (10x28 мм)
- малые объемы анализируемых проб ( до 50 мкл)
- не нужны: полимерное связующее, пластификатор, летучий растворитель

- простой процесс получения ИСЭ на их основе (занимает 5-10 минут)
- ИЖ может играть роль инертной матрицы, позволяя иммобилизовать электродноактивный компонент.

В работе [18] изучены ионные жидкости  $\text{TOA}^+\text{BSB}^-$ ,  $\text{THA}^+\text{BSB}^-$  и  $\text{TOMA}^+\text{BSB}^-$ , твердые при комнатной температуре, как электродноактивные соединения ИСЭ для определения ионов в водных растворах. Было проведено сравнение электрохимических характеристик жидкостного и твердотельного ИСЭ на основе данных ИЖ, которое показало, что твердотельные электроды ничуть не уступают по характеристикам электродам с пластифицированной мембраной. Характерны малое время отклика ( $\sim 10$  с), хорошая воспроизводимость. Для улучшения селективности твердотельного электрода на иодид-ион ИЖ  $\text{TOA}^+\text{BSB}^-$  использовали как матрицу для активного компонента тетра-трет-бутил-фталоцианин хлорид алюминия(III). В результате наблюдалась анти-Гофмейстерская селективность по отношению к иодиду, определению сильнее всего мешает только додецилсульфат-ион.

1.1.2. Разработка лабораторных образцов биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе биоэлектрокатализа ферментами гидрогеназами.

*Прямой биоэлектрокатлиз.* Прямой биоэлектрокатализ был впервые продемонстрирован в Советском Союзе для лакказы [19]. В случае прямого биоэлектрокатализа электрод выступает в качестве второго субстрата принимая (или отдавая) электроны на (от) фермент(а). Таким образом, прямой биоэлектрокатализ, по сути, представляет собой туннелирование электрона между редокс-активным центром фермента и электродом, а значит, зависит от структуры фермента, (точнее, расположения редокс-активных центров) ориентации и, экспоненциально, от расстояния электронного трансфера [20]. Это означает, что эффективный обмен электронами между ферментом и электродом возможен только при соблюдении следующих условий [21]:

1) редокс-активный центр расположен близко к поверхности белковой глобулы;

- 2) фермент ориентирован этим центром к поверхности электрода;
- 3) фермент способен иммобилизоваться без потери активности;
- 4) *in vivo* электрон от активного центра переносится на редокс-активный центр другой молекулы.

Количество ферментов, удовлетворяющих указанным требованиям и для которых был продемонстрирован прямой биоэлектрокатализ, существенно меньше, чем ферментов, вовлекаемых в медиаторный биоэлектрокатализ. Л. Гортон с соавторами продемонстрировал прямой биоэлектрокатализ для целого ряда гем-содержащих редокс-активных ферментов, включая цитохром *c*, целлобиозодегидрогеназу, D-фруктозодегидрогеназу и алкогольдегидрогеназу [22]. Существует целый ряд работ по прямому биоэлектрокатализу лакказы [23, 24], билирубиноксидазы [25], аскорбат оксидазы [26].

RQQ-дегидрогеназы, как правило, относительно легко вовлекаются в прямой биоэлектрокатализ. Гем, входящий в состав этих молекул, выполняет роль, своего рода, «встроенного» медиатора. Прямой биоэлектрокатализ D-фруктозодегидрогеназой и алкогольдегидрогеназой продемонстрирован на целом ряде электродов различных типов: золотых, платиновых, стеклоуглеродных, серебряных. Широкий интерес к этим ферментам вызван возможностью их использования для создания анодов биотопливных элементов.

Лакказа и билирубиноксидаза содержат комплексы меди рядом с поверхностью белковой глобулы, что делает возможным туннелирование электрона между ферментом и электродом [27].

Активный центр гидрогеназ глубоко погружен в большую субъединицу. Однако, как показано выше, система, состоящая из 3 железо-серных кластеров, переносит электроны непосредственно на поверхность, делая тем самым возможным наблюдение прямого биоэлектрокатализа для гидрогеназ. При этом необходимо добиться правильной ориентации фермента на поверхности электрода. Наблюдение прямого биоэлектрокатализа возможно только при расположении дистального железосерного кластера максимально близко к поверхности электрода. Нативные медиаторы, например, цитохром, могут блокировать данный процесс. Поэтому мембраносвязанные ферменты, как правило, труднее вовлечь в

биоэлектродкатализ, поскольку они значительно сильнее связаны с акцепторами по сравнению с цитоплазматическими гидрогеназами.

*Методы повышения эффективности биоэлектродкатализа.* Эффективность прямого биоэлектродкатализа для растворенных молекул ферментов, как правило, низкая. Это объясняется крайне низкой скоростью диффузии биомолекул к поверхности электрода и значительными стерическими затруднениями. Эффективный прямой биоэлектродкатализ требует постоянного надежного взаимодействия между электродом и ферментом. Для этого необходимо добиться решения двух задач: 1) иммобилизовать фермент на поверхности электрода без значительной потери активности, 2) добиться переноса электрона между электродом и активным центром переноса.

В литературе выделяют пять различных стратегий иммобилизации ферментов на поверхности электрода: адсорбция, микроинкапсулирование, захват, образование поперечных сшивок (cross-linking) и ковалентное связывание [28]. Адсорбция считается, как правило, самым мягким способом иммобилизации, при этом фермент остается фактически в окружении молекул буферного раствора. Адсорбция основана на слабом межмолекулярном взаимодействии, что зачастую приводит к низкой стабильности ферментного слоя. Эту проблему можно решить за счет химического связывания ферментов с поверхностью электрода. Но зачастую это приводит к снижению активности и стабильности фермента за счет изменения его трехмерной структуры и резкого ограничения подвижности. Поперечное сшивание при помощи, например, глутарового альдегида, как правило, не нарушает трехмерную структуру белка, но затрудняет переходы между различными формами фермента в процессе катализа.

Захват – это процесс включения фермента внутрь полимера, физически затрудняющего диффузию фермента от электрода. К недостаткам подобной методики, кроме аналогичных для метода поперечных сшивок, относится также затруднение диффузии субстратов (продуктов) к (от) ферменту (а). Микроинкапсулирование – метод, при котором фермент включается в внутрь мицеллы. Этот метод позволяет не только добиться высокой стабильности фермента, но и повысить его активность (т.н. «суперактивность», показанная, например, для пероксидазы [29] и лакказы [30]). Но данный метод крайне редко

используется для создания ферментных электродов, поскольку величина плотности тока, как правило, лимитируется диффузией субстрата или электронов через полимер [28, 31].

Для обеспечения правильной ориентации электроактивных белков на электроде в [32 – 43] было предложено использовать заряженные соединения – промоторы. Промоторы способствуют правильной ориентации фермента на электроде, но при этом не блокируют систему переноса электрона. Использование промоторов позволяет создавать на поверхности электрода так называемые «самособирающиеся слои». Как правило, промоторы состоят из двух функциональных групп – одна обеспечивает закрепление на электроде, а вторая отвечает за взаимодействие с ферментом. Многие «внешние» оксидоредуктазы проявляют способность к биоэлектрокатализу только в присутствии промоторов ориентации. В частности, в случае *p*-крезолметилгидроксилазы [42] биоэлектрокатализ наблюдается только в присутствии многозарядных катионов: аминокликозидов, полиаминов, неорганических катионов. В [43] в качестве промотора для лакказы использовался 4-аминотиофенол. В целом ряде работ в качестве промоторов использовались кофакторы, пришитые через алкильные мостики непосредственно к поверхности электрода или наночастиц [35, 44]. Но этот метод при всей его привлекательности не стал универсальным, поскольку кофакторы часто блокируют электронное взаимодействие между электродом и ферментом [32, 45].

Гидрогеназы из *D. desulfuricans* [46], *M. elsdenii* [47] способны осуществлять биоэлектрокатализ так же лишь в присутствии соединений, несущих значительный положительный заряд. В качестве таких соединений могут быть использованы полилизин [47] или аминокликозиды – неомицин, полимиксин и др. [48]. В работе [49] показано, что из аминокликозидов наилучшим промотором активности гидрогеназы из *D. gigas* является неомицин. В случае гидрогеназ природный субстрат – цитохром *c*<sub>3</sub> несет значительный положительный заряд, соответственно гидрогеназы имеют группу аминокислот с отрицательно заряженной боковой цепью около приповерхностного редокс активного железо-серного кластера [41, 50]. Поскольку адсорбция фермента не изменяется при добавлении промоторов [51], можно предположить, что некоторые гидрогеназы без промотора



ориентированы на электроде таким образом, что приповерхностная редокс группа направлена в сторону от электрода, и туннелирование электрона невозможно. При добавлении промотора поверхность электрода приобретает значительный положительный заряд, и фермент адсорбируется в положении, обеспечивающем максимальную близость активного центра и электрода, а значит, и эффективное туннелирование электрона между ними. В работе [34] для гидрогеназы из *S. vinosum* показано, что добавление промотора позволяет не только увеличить активность и стабильность слоя адсорбированного фермента, но и позволяет достичь максимальной однородности констант переноса электрона, что позволило наблюдать методом циклической вольтамперометрии редокс переходы активного центра фермента.

Одним из методов улучшения контакта между ферментом и электродом может быть использование проводящих полимеров. Согласно теории, поддерживаемой в ряде работ [35, 36 – 38], такие проводящие полимеры, как полипиррол, полианилин, полиацетилен и т.д., облегчают электронный трансфер за счет наличия системы сопряженных  $\pi$ -электронов. Техника включения биомолекул в проводящую матрицу через прямое электроосаждение полимеров в присутствии фермента активно применялась в значительном количестве работ (см., например, обзор [10]). Следует отметить, что проводящие полимеры возможно использовать и в качестве промоторов ориентации, включая в состав полимера заместители с различными функциональными группами, несущими необходимый заряд. При этом не всегда возможно установить, какой из механизмов в наибольшей степени влияет на активность биоэлектрокатализа.

Существует ряд работ, в которых в качестве проводящей матрицы предложено использовать золь-гель с различными углеродсодержащими компонентами. Например, с графитовыми наночастицами [39] или проводящими углеродными чернилами [40].

Широко распространенным методом вовлечение ферментов в биоэлектрокатализ является предобработка поверхности электрода для придания ему необходимого заряда (например, обработкой кислотами, или отжигом при ограниченном доступе кислорода), либо использование таких материалов, как

высокоориентированный пиролитический графит, несущий на поверхности большое количество функциональных групп (таких, как C=O, C–OH, COOH) [42].

За последнее двадцать лет огромное внимание ученых было уделено применению углеродных наночастиц в создании биоэлектродов. Они обладают небольшими размерами, позволяющими (по крайней мере, в теории), установить контакт между активным центром фермента и электродом. Опубликованы сотни статей в данной области. На сегодняшний день методы работы с этим материалом можно свести к следующим типам: 1) ковалентное связывание [52], 2) физическая адсорбция [53, 54], 3) включение в объем электрода [55]. Однако принципиального улучшения характеристик наночастицы пока не принесли. Наблюдаемые плотности тока окисления водорода достигают первых сотен мкА на см<sup>2</sup>. Самые большие плотности тока для подобных систем описаны в работе [56] и составляют 1,6-1,7 мА/см<sup>2</sup>. Однако эти данные соответствуют максимумам на циклических вольтамперограммах, а не стационарным токам, что некорректно в применении к топливным элементам. При этом системы на основе наночастиц углерода обладают целым рядом недостатков, главные среди которых – сложность методик изготовления и низкая физическая стабильность создаваемых электродов.

1.1.3. Разработка методики определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии.

Несимметричный диметилгидразин (НДМГ) является наиболее эффективными высокоэнергетическим ракетным топливом. В ходе эксплуатации ракетной техники в местах заправки, хранения и приземления отделяющихся частей ракет-носителей происходит загрязнение окружающей среды НДМГ. В то же время он сильно токсичен, обладает всем спектром отдаленных эффектов, в том числе является опасным канцерогеном. Для него установлен ориентировочно допустимый уровень (ОДУ) в природных водах и водах хозяйственно-бытового использования, равный 0,0006 мг/л [57]. В настоящее время методик, способных на

практике решать задачу определения НДМГ в водах на уровне, установленном гигиеническим нормативом нет.

Существующие методы количественного определения гидразинов можно условно разделить на две группы. К первой группе относятся методы прямого определения этих соединений, основанные, в основном, на окислительно-восстановительных свойствах гидразинов. Методы второй группы используют предварительную дериватизацию гидразинов. Новые свойства образующихся производных позволяют расширить круг подходов, применяемых для определения гидразина и его замещенных аналогов.

Гидразин и его замещенные не поглощают излучение, поэтому для их определения необходимо проведение дериватизации с целью введения в их состав хромофорной группы. Предел обнаружения спектрофотометрического метода 1 мкг/л может быть достигнут только при выборе реагентов образующих производные с высокими молярными коэффициентами поглощения  $n \cdot 10^4$ . Однако низкие гигиенические нормативы вызывают необходимость создания еще более чувствительных методик определения гидразинов. Экстракция является одним из наиболее простых и доступных методов концентрирования, который применяется при достаточной гидрофобности производных, как правило, гидразонов ароматических альдегидов. Разработаны экстракционно-фотометрические методики определения НДМГ в водах с применением коричневого [58 – 60] и п-нитро- бензальдегидов [61] с нижней границей 0.02 и 0.01 мг/л. Возможно также проточно-инжекционное определение НДМГ в виде 5,7-динитробензофуразанового производного [52] с пределом обнаружения 0.02 мг/л.

Специалистами РНЦ «Прикладная химия» [63] предложено использовать газовую экстракцию для извлечения НДМГ из образцов воды, а также суспензий почвы и измельченных растительных материалов. При проведении газовой экстракции создают сильнощелочную среду и добавляют гидроксилламин, который помимо обеспечения восстановительной атмосферы разлагается с образованием азота, обеспечивая унос НДМГ из реакционной смеси. При анализе воды объем исходной пробы составляет 150 мл, а конечный фотометрируемый раствор имеет объем 10 мл. Для определения НДМГ в водах в диапазоне 0,0005-0,1 мг/л предложено сочетать последовательно статическое сорбционное концентрирование

НДМГ на катионообменнике в  $H^+$ -форме и газовую экстракцию. Однако общепризнано, что спектрофотометрия уступает большинству методов по селективности и при анализе объектов окружающей среды велика вероятность ложноположительного обнаружения НДМГ.

Метод прямой спектрофлуориметрии основан на измерении флуоресценции соединений при их облучении. Его преимуществом (как и спектрофотометрии) в отличие от других физико-химических методов химического анализа является высокая экспрессность самого измерения и простота проведения измерения. К сожалению, в настоящее время отсутствуют чувствительные подходы для флуориметрического определения НДМГ. Известные реагенты не дают флуоресцирующих продуктов с НДМГ (или их флуоресценция очень слабая), либо сами реагенты, как например коричный альдегид, обладают собственной флуоресценцией и детектирование сигнала производного на фоне избытка реагента превращается в проблему.

Капиллярная газовая хроматография (ГХ) требует обязательной дериватизации с последующим извлечением производного в фазу органического растворителя. В качестве реагентов находят широкое применение альдегиды (табл.1): ацетон, пентафторбензальдегид, салициловый альдегид, орто- и паранитробензальдегиды, а также пентафторбензоилхлорид. Выбор реагента для дериватизации во многом связан с последующим вариантом детектирования, например, пентафторбензоильные производные и детектор электронного захвата.

Возможности современных газовых хроматографов проиллюстрированы в работе [64], где производные экстрагировали из водной фазы равным объемом органического растворителя. При количественном извлечении производных (гидразонов) в органическую фазу пределы обнаружения НДМГ при использовании МС-детектора составили 0,5- 1,1 мг/л для разных реагентов. Более низкие пределы обнаружения гидразинов в газовой хроматографии достигают, используя более чувствительные детекторы, такие как ДЭЗ или АФД, и предварительное концентрирование.

Среди возможных методов извлечения во всех описанных в табл.1 случаях использовали жидкостную экстракцию. В ходе экстракции происходит не только концентрирование, но и смена матрицы с водного раствора на органический

растворитель. Рекомендуется после экстракции дополнительно проводить очистку экстракта на колонке с оксидом алюминия. Хотя эта стадия значительно повышает трудоемкость определения, она позволяет решить ряд задач.

Таблица 1 – Газохроматографические методы определения гидразина и его метильных производных.

Компоненты	Органический реагент	Детектор	Предел обнаружения	Объект исследования	Литература
НДМГ	п-НБА п-хлорБА п-цианоБА	МС, m/z 193 МС, m/z 193 МС, m/z 193	0,8 мг/л 1,1 0,5	природные воды	[64]
Даминозид	2-нитро-бензальдегид	МС, m/z 193	0,4 мкг/кг	пищевые продукты	[65]
НДМГ	2-нитро-бензальдегид	ЭЗД	1 мкг/л (вытяжка)	фрукты	[66]
НДМГ	4-нитро-бензальдегид	АФД ПВД МС	3 мкг/кг 10 мкг/кг 8 мкг/кг	почва	[67]
НДМГ	ацетон	АФД	4 мкг/мл	воздух	[68]
НДМГ	пентафтор-бензоилхлорид	МС	5 мкг/л	почва, озерные воды, растения	[69]
Гидразин	ацетон	АФД	0,1 мкг/л	вода	[70]
Гидразин	пентафтор-бензальдегид	МС	5 пг	моча, слюна	[71]
НДМГ-даминозид	пентафтор-бензоилхлорид	МС	0,01 мг/л 0,027 мг/л	концентрат яблочного сока	[72]
НДМГ	2-нитро-бензальдегид	ЭЗД	3 мкг/л	фруктовый сок	[73]
метил-гидразин	пентафтор-бензальдегид	ЭЗД	5 пг	кровь	[74]
НДМГ	пентафтор-бензоилхлорид	ЭЗД	0,04 мг/л	сок	[75]

Прежде всего, удалить матрицу, что позволяет достичь лучшего соотношения сигнал/шум. Кроме того, удалить избыток реагента, который при концентрировании пробы упариванием может выпадать в осадок. И, наконец, можно сменить органический растворитель на более благоприятный для последующего хроматографического анализа.

Заключительной стадией пробоподготовки при газохроматографическом определении гидразинов является упаривание до минимального объема (1 мл и менее). В конечном итоге, степень концентрирования составляет до 500 раз [76].

Помимо выбора высокочувствительных схем детектирования путем подбора оптимальной системы реагент - детектор, а также улучшения соотношения сигнал/шум благодаря очистке и концентрированию производного в ходе пробоподготовки, известный прием - это ввод больших объемов пробы в хроматограф. Для достижения максимальной чувствительности определения НДМГ на уровне ОБУВ в воде в виде его гидразона с п-нитробензальдегидом в работе [76] вводили в испаритель хроматографа 10 мкл пробы без деления потока и использовали азотно-фосфорный детектор.

Отдельно отметим, что в методических указаниях МУК 4.1.1211-03 «Газохроматографическое определение несимметричного диметилгидразина в воде» [77], предназначенного для определения НДМГ на новом уровне ОДУ – 0,06 мкг/л в воде допущена ошибка при расчете концентраций градуировочных растворов на порядок в меньшую сторону. Таким образом, вместо декларируемой минимально определяемой концентрации 0,03 мкг/л реальная концентрация, от которой происходят измерения, составляет 0,3 мкг/л. Соответственно вызывают сомнения и результаты работы [76], поскольку она написана теми же авторами, что и МУК 4.1.1211-03.

Таким образом, газовая хроматография требует трудоемкой подготовки. Но даже в случае экстракционного концентрирования и упаривания концентрата известные подходы не обеспечивают определения необходимых ультрамалых концентраций НДМГ.

Альтернативу газовой хроматографии при определении НДМГ представляет жидкостная. В кислых растворах гидразин и его производные превращаются в заряженные соединения за счет протонирования атома азота. Это свойство активно используется для прямого определения методом *ионной хроматографии* с разделением на катионообменниках по механизму ионного обмена.

Впервые разделение гидразина, метилгидразина, НДМГ и 1,2-диметилгидразина (СДМГ) с помощью ионообменной ВЭЖХ с электрохимическим детектором осуществлено проводили на колонке, заполненной полимерным

сульфокатионообменником высокой емкости Aminex A-5, в 1981 году в работе [78]. Амперометрическое детектирование проводили при величине приложенного потенциала +1.0 В относительно Ag/AgCl электрода. Значение минимально определяемой концентрации для ММГ составило 17 нг, для СДМГ — 10 нг, для НДМГ — 8 нг, гидразина - 80 нг. Оптимизация условий детектирования и выбор более подходящих условий хроматографического разделения позволил существенно снизить пределы обнаружения: для гидразина — 0.4 мкг/л, ММГ — 0.6 мкг/л, НДМГ — 1 мкг/л, СДМГ — 2 мкг/л, – при объеме вводимой пробы 0.5 мл [79].

Один из первых подходов, предложенных для определения гидразинов методом ОФ ВЭЖХ, был основан на использовании салицилового альдегида в качестве дериватизирующего агента в сочетании с УФ-детектированием полученных производных при доступной авторам длине волны - 254 нм [80]. При объеме вводимой пробы 20 мкл пределы обнаружения составили 2 и 5 мг/л для гидразина и НДМГ соответственно. Улучшить пределы детектирования до 0,025 и 0,2 мг/л для гидразина и НДМГ удалось при использовании более чувствительного амперометрического детектирования [81].

Дибензофурановые производные гидразина и НДМГ также оказались устойчивыми в условиях ВЭЖХ измерений, что позволило, учитывая их также высокие молярные коэффициенты поглощения и благоприятные характеристики для концентрирования, предложить реакции образования этих производных для разработки нескольких ВЭЖХ методик высокочувствительного определения гидразинов. В работах М.И. Евгеньева с сотр. впервые предложено определять гидразин [82] и НДМГ [83] в виде 5,7-динитробензофуранового производного в водах методом ВЭЖХ. Хроматографическое определение проводили на колонке Hypersil ODS (4 × 250 мм) с использованием градиентного элюирования. Предел обнаружения составили 0.015 и 0.12 мг/л для гидразина и НДМГ соответственно. Для определения меньших концентраций было предложено проводить концентрирование. Практически количественное извлечение производного НДМГ из 100 мл пробы достигается при однократной экстракции хлороформом из подкисленного до pH 4–5 образца анализируемой воды с дальнейшей отгонкой

растворителя и перерастворением остатка в 1 мл метанола. Предел определения НДМГ составил 0,003 мг/л.

Для определения НДМГ методом НФ ВЭЖХ использовали его дериватизацию с 4-нитробензальдегидом и концентрирование полученного продукта с помощью твердофазной экстракции на патронах Диапак C<sub>16</sub> [84]. При объеме вводимой пробы 20 мкл предел обнаружения, достигнутый при использовании спектрофотометрического детектора при длине волны 350 нм, составил 30 мкг/л без концентрирования и 3 мкг/л с предварительным сорбционным концентрированием.

Описанные в литературе ВЭЖХ методики определения НДМГ не обеспечивают требуемой нижней границы определяемых концентраций. Однако ВЭЖХ хорошо сочетается с динамическим on-line концентрированием, характеризующимся высокой степенью концентрирования, эффективностью благодаря полному использованию концентрата в ходе определения и возможностью автоматизации для снижения трудоемкости определения. Таким образом, разработка такого комбинированного варианта определения является перспективной для решения задачи определения НДМГ в воде от 0,00005 мг/л.

1.1.4. Разработка методики определения пенициллиновых антибиотиков в пищевых продуктах, методики определения 1-нафтиламина в биологических жидкостях.

Несмотря на все большее распространение современных аппаратных методов анализа, потребность в экспрессных и простых методах остается актуальной. Среди таких методов благодаря своей простоте и чувствительности выделяются кинетические. Однако число органических соединений, определяемых этими методами, относительно невелико. Потенциал кинетических методов анализа, основанных на собственном действии органических аналитов, раскрыт далеко не полностью. Актуальным является расширение круга соединений, определяемых кинетическими методами, чему и посвящена данная работа.

В кинетических методах анализа чаще всего используют фотометрическую регистрацию сигнала. Повысить чувствительность позволяют флуориметрические



и хемиллюминесцентные методы, позволяющие фиксировать меньшие количества индикаторного вещества, чем фотометрические. Хемиллюминесцентные методы основаны на проведении реакций, в ходе которых генерируется люминесценция, интенсивность которой также, вообще говоря, меняется со временем. Аналит может либо быть участником реакции, либо тем или иным образом влиять на ее протекание. Существенно, что концентрация аналита может быть намного ниже концентраций реагентов, поэтому такие хемиллюминесцентные методы аналогичны обычным каталитическим. Механизм влияния аналитов в большинстве работ не установлен; чаще всего аналит, по-видимому, вмешивается в индикаторную реакцию по радикальному механизму. Хемиллюминесцентные методы рассмотрены в монографии [85] и обзорах [86, 87].

Наиболее распространенный хемиллюминесцентный реагент – люминол. В реакциях каталитического окисления люминола образуется возбужденная форма 2-аминофталата, излучающая свет при 425 нм. По ускоряющему или замедляющему действию в таких реакциях можно определять металлы и органические соединения с пределами обнаружения от  $10^{-6}$  до  $10^{-12}$  М (типичные значения –  $10^{-9}$  М). Определению органических соединений хемиллюминесцентным методом бывает посвящено около 10 статей в год (из них половина – с использованием ферментативных реакций).

Перечислим некоторые методики определения органических соединений по влиянию на протекание хемиллюминесцентных реакций. В обзоре [86] сообщается об определении 4-аминофенола (2 нМ, приводим пределы обнаружения), рутина (50 пМ), берберина (50 пМ) по ингибированию реакций окисления люминола гексацианоферратом(III), периодатом и  $H_2O_2$ , а L-цистеина (8 нМ), фентоламина (10 нМ), мочевой кислоты (20 мкМ), паратиона (30 нМ), изониазида (4 нМ), добутамина (80 пМ), рибофлавина (9 нМ) – по активированию таких реакций. Аскорбиновую кислоту (0.04–10 мг/л, предел обнаружения  $4 \cdot 10^{-4}$  мг/л,  $s_r = 0.02$  для 0.9 мг/л) определяли по люминесценции люцигенина при его окислении кислородом воздуха в присутствии железа(III) и неионного ПАВ Бридж-35, который повышал интенсивность сигнала на два порядка [88]. Тримепразин и метотримепразин на уровне нескольких мг/л определяли по реакции *бис*(2,4,6-трихлорфенил)оксалата с  $H_2O_2$  [89]. Салициловую кислоту определяли по ее

активирующему действию в хемилюминесцентной реакции 1,10-фенантролин – Cu(II) – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии бромида цетилтриметиламмония [90]. Нанogramмовые количества фосфорсодержащих пестицидов определяли по реакции окисления люминола перборатом [91]. Хемилюминесцентным методом удобно определять перекисные соединения, например, дипероксикислоты по реакции с люминолом (предел обнаружения 0.002 мг/л) [92].

В хемилюминесцентном методе чаще всего используют люминол, но иногда применяют и другие восстановители, например, пирогаллол при окислении различными окислителями. Окисление пирогаллола периодатом использовали для определения глюкозы и фруктозы, диолов и пропранолола по избытку периодата [87].

Хемилюминесцентное детектирование применяли в капиллярном электрофорезе [93]. Аминокислоты разделяли методом капиллярного электрофореза, вводя элюат в хемилюминесцентную реакцию люминол – пероксид водорода, катализируемую медью(II). Аналиты, связываясь с ионом металла, ингибировали люминесценцию. Пределы обнаружения аминокислот были порядка 10<sup>-6</sup> М [94]. По активирующему действию в этой же реакции определяли белки (бычий и человеческий сывороточный альбумин, человеческий гамма-глобулин и яичный альбумин с пределами обнаружения 0.03–0.05 мг/л) [95].

Есть сообщения о разработке аналитических методик на основе *фотохемилюминесцентных* реакций. Так, определяли 0.04–2.0 мг/л цитрата, фотохимически разлагая его комплекс с железом(III); образующееся в результате железо(II) катализировало реакцию автоокисления люминола [96]. Подчеркнем, что работ, основанных на фотохемилюминесцентных реакциях, опубликовано крайне мало.

*Методы определения 1-нафтиламина.* Одним из соединений, методика определения которого разработана нами, является 1-нафтиламин – токсичное соединение, которое к тому же является маркером отравления человека полициклическими углеводородами. Известен целый ряд методик определения 1-нафтиламина: спектрофотометрические, хроматографические, электрохимические и т. д.; в некоторых из них применяется концентрирование. Рассмотрим принципы, на которых основаны эти методики.

*Фотометрическое определение.* Спектрофотометрические методы определения 1-нафтиламина основаны на образовании окрашенных производных, чаще всего диазо-производных. В качестве диазотирующих агентов используются 4-диазоацетофенон [97], 4-дiazосульфаниловая кислота [98], 4-дiazонитробензол [99]. Реакция, как правило, проводится в кислой среде, т.к. при  $\text{pH} > 7$  диазопроизводные разрушаются. В последнем методе используется концентрирование 1-нафтиламина на пенополиуретане и измеряется спектр диффузионного отражения. Также известен метод [100] в котором 1-нафтиламин образует окрашенное производное с  $\text{Mn}(\text{CN})_5\text{NO}_2^-$ . В этом методе также возможно концентрирование 1-нафтиламина экстракцией хлороформом.

*Хроматографическое определение.* Для определения 1-нафтиламина могут использоваться различные варианты хроматографии: газовая, жидкостная, ионная, хромато-масс-спектрометрия. Методику [101] использовали для определения содержания изомеров нафтиламина в табачном дыме. Он заключается в газохроматографическом определении N-пентафторпропионамида нафтиламина. Методика [102] показывает, что возможно определение пикограммовых количеств 1-нафтиламина. В ней используется катионообменная колонка, в качестве элюента выступает ацетатно-цитратный буфер  $\text{pH}$  5.2. В методике [103] используют микроэкстракцию 1-нафтиламина ионной жидкостью – гексафторфосфатом 1-гексил-3-метилимидазолия – при  $\text{pH}$  11, экстракт разбавляют элюентом (метанол-вода, 1:1 об.) и вводят в хроматограф с УФ-детектором. Методика [104] показывает возможность применения ионной хроматографии для определения 1-нафтиламина. В методике [105] хроматографии предшествует экстракция 1-нафтиламина в виде ионной пары с бис-2-этилгексилфосфатом. Полученное производное далее определяют хроматографически с масс-спектрометрическим детектором или дериватизируют еще раз с помощью изобутилоксикарбонила. В методике [106] используют десорбцию микроволновым излучением 1-нафтиламина, предварительно сорбированного на силикагеле. Далее пары нафтиламина повторно сорбируют на волокнах, которые помещаются в инжектор газового хроматографа, откуда нафтиламин поступает в хроматографическую колонку.

*Влияние на колебательную реакцию Белоусова – Жаботинского* [107]. При введении в данную реакцию 1-нафтиламина происходит изменение периода

колебаний и амплитуды. Предполагаемый механизм влияния 1-нафтиламина следующий: нафтиламин может окисляться образующимся в реакции бромом до 1,4-нафтохинона, который может координировать  $\text{Ce(III)}$ . Таким образом, выводится часть реагентов и соответственно изменяется период и амплитуда колебательной реакции.

*Фосфоресценция* [108]. Данный метод используют для определения 1-нафтиламина и *N*-1-нафтилфталевой кислоты в смеси, измеряя непосредственно фосфоресценцию этих веществ. Для увеличения сигнала и предотвращения окисления кислородом воздуха используют смесь 0.2 М нитрата таллия(I) и сульфита натрия.

*Электрохемилюминесценция* [109]. Суть данного метода заключается в электрогенерации окислителя, который вызывает хемилюминесценцию. В реакции участвуют 1-нафтиламин, бис(2,4,6-трихлорфенил)оксалат и пероксид водорода. Последний генерируется на электроде из растворенного в воде кислорода. Интенсивность ЭХЛ измеряется как функция потенциала.

*Электрохимические методы.* Определение 1-нафтиламина проводят на модифицированных сенсорах. В методике [110] в качестве модификатора углеродного электрода используют  $\text{Na}_2\text{NH}_4[\text{Fe}(\text{CN})_5]$  (пиридин-4-карбоксальдегид), в методике [111] –  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -циклодекстрины; нафтиламин определяют в форме иминопроизводного с бензальдегидом. Возможно также определение на кремниевом электроде, модифицированном бором [112].

*Фотохемилюминесцентных* методов определения 1-нафтиламина в литературе не обнаружено.

#### 1.1.5. Выводы к обзору литературы

Рассмотрено современное состояние вопросов, связанных с разработкой ионселективных электродов на основе ионных жидкостей, биосенсоров для определения молекулярного водорода, методик определения несимметричного диметилгидразина в водах, а также методик определения антибиотиков и 1-нафтиламина в биологических жидкостях. Обсуждены области применения этих

методов, их основные недостатки. Показана актуальность и перспективность новых решений указанных вопросов.

## 2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

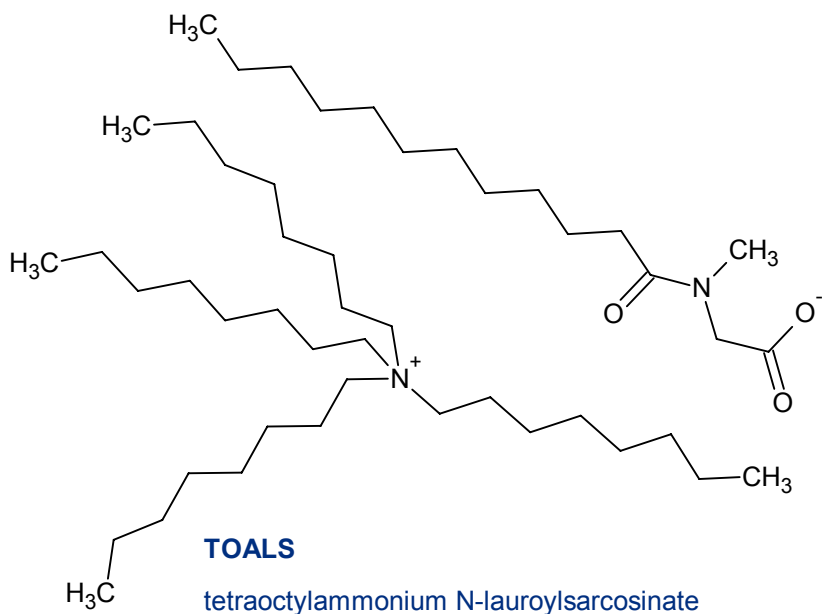
### 2.1. Выбор направления исследований, методы решения задач

Направлением исследований третьего этапа работ была разработка новых способов и устройств (в том числе на основе ионных жидкостей и биосенсоров) для определения содержания катехоламинов, токсичных компонентов ракетного топлива и других физиологически активных веществ.

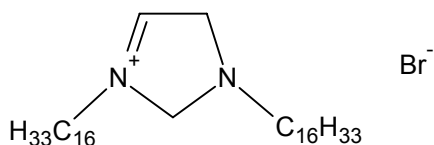
Цель работы по направлению 3.1. календарного плана состояла в разработке лабораторных образцов ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот.

Как следует из обзора литературы, ионные жидкости – перспективные материалы для создания создания электрохимических сенсоров. На наш взгляд, весьма интересны ионообменные свойства ИЖ и их способность пластифицировать полимерные материалы. Это сочетание позволяет прогнозировать привлекательность ИЖ как компонентов пластифицированных мембран ионселективных электродов (ИСЭ). В то же время ионная проводимость в комплексе с экстракционной активностью позволяет использовать ИЖ в составе модифицирующих композиций при разработке вольтамперометрических сенсоров. В соответствии с этим в рамках работы получали ион-селективные электроды для потенциометрического анализа и модифицированные печатные электроды для вольтамперометрического анализа. Использованные ионные жидкости показаны на рис. 1.

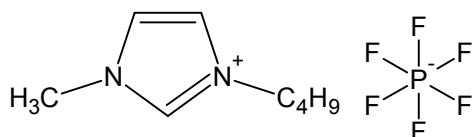
По направлению 3.2. календарного плана намечена разработка лабораторных образцов биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе бозлектрокатализа ферментами гидрогеназами.



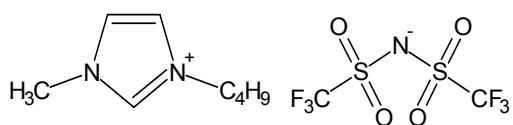
**TOALS** N-Лауроилсаркозинат тетраоктиламмония



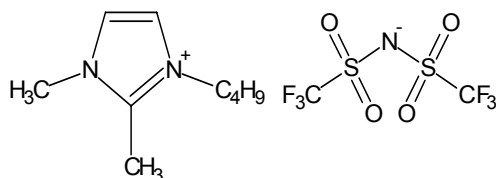
**DHDImBr** 1,3-дигексадецил-имидазолия бромид



**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 1 – Используемые в работе ионные жидкости.

Активное развитие отраслей связанных с производством, хранением и транспортом водорода вызывает потребность создания различных сенсоров на

водород. Уже сейчас он в больших количествах используется космической промышленностью, с каждым годом растёт число автомобилей, функционирующих на водороде, всё больше компаний предлагают потребителям водородные топливные элементы. Однако, водород – газ без цвета, вкуса и запаха с крайне низким пределом воспламеняемости. В связи с этим встают проблемы его детектирования при получении, транспортировке и хранении.

Сенсоры для определения водорода в газовых средах разрабатываются уже довольно давно. Сенсор, состоящий из палладиевого диода Шоттки на кремниевой подложке, был впервые разработан в [113]. Слой водород-чувствительного металла (палладий или его производные) наносится на оксид, покрывающий полупроводник. Позже появился целый ряд работ, использующих подобные системы [114 – 116]. Сенсоры такого типа нашли своё применение в промышленности и используются для детекции утечек водорода при запуске космических ракет [114].

Палладий активно использовался различными исследователями для конструирования водород-чувствительных систем. В [117] разработан целый ряд химически чувствительных полевых транзисторов. В [116] сообщается о водородном сенсоре, состоящем из системы микрочастиц сплава никеля с палладием. В [118] для определения водорода использовали изменение оптических свойств наночастиц платины.

Однако для систем, использующих палладий, и подобных им характерен ряд недостатков. Они функционируют при высоких температурах ( $>200^{\circ}\text{C}$ ), а для реактивации чувствительного элемента необходимо периодически повышать её до 500 и более градусов. Чувствительный элемент способен реагировать на другие соединения, присутствующие в атмосфере, включая углеводороды [119]. В частности, это делает невозможным применение подобных систем для детекции водорода в среде водородсинтезирующих микроорганизмов. Но по различным оценкам к 2020 году более 30 % всего получаемого водорода будет иметь биологическое происхождение.

В свете указанных недостатков очевидным выглядит использование ферментативных реакций для детекции водорода, поскольку ферменты демонстрируют высокие активность и селективность уже при комнатной

температуре. В природе реакции окисления/выделения водорода катализирует фермент гидрогеназа. Схема процесса можно представить уравнением  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ .

К несомненным достоинствам гидрогеназ относится также избирательность к катализируемой реакции. Это позволит использовать сенсоры в сложных смесях (главным образом, культуральных средах продуцирующих водород микроорганизмов) без дополнительных очистки и (или) пробоподготовки.

В августе 2005 года в журнале *Analytical Chemistry* появилась первая статья, посвященная созданию электрохимического биосенсора на основе гидрогеназы для определения концентрации водорода [120]. Устройство биосенсора предполагало использование растворенной в буферном растворе гидрогеназы, что резко снижает воспроизводимость отклика. В совокупности с чересчур низкими характеристиками биосенсора это не позволило создать на основе предлагаемой схемы успешные аналитические устройства. Поэтому в текущей работе предлагается использовать электроды с иммобилизованной на них гидрогеназой. При этом предполагается проводить сайт-ориентированную иммобилизацию для достижения наибольших плотностей тока, что, в свою очередь, позволит добиться низкого предела обнаружения.

По направлению 3.5. календарного плана целью была разработка методики определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии.

Определение следовых количеств веществ на фоне сложных матриц природных объектов всегда является трудной задачей, решаемой с помощью хроматографических методов, отличающихся наиболее благоприятным сочетанием высокой селективности благодаря разделению на колонке и чувствительности среди других физико-химических методов, применяемых для определения органических веществ. Однако возможности хроматографии (как в прочем и других методов) ограничены по чувствительности, что требует проведения предварительного концентрирования. Решить задачу определения ультрамалых концентраций НДМГ (от 0,0005 мг/л) можно только выбором подходящего сочетания метода концентрирования и определения.



Арсенал методов разделения и концентрирования достаточно велик и постоянно пополняется, но в каждой области химического анализа используется совершенно определенный набор таких методов. Кроме того, выбор метода концентрирования определяется свойствами микрокомпонентов (гидрофобностью, летучестью, молекулярной массой и другими), коэффициентом концентрирования, необходимым для достижения заданной чувствительности определения, и требованиями к макросоставу концентрата. Для полярных азотсодержащих веществ, куда входят короткоцепочечные алифатические амины и гидразины, круг этих методов также определен и в основном связан с их физико-химическими свойствами.

Сложность определения гидразина в природных средах связана с его неограниченной растворимостью в воде и низкой растворимостью в малополярных средах, используемых для экстракционного концентрирования, высокой склонностью к окислению при выполнении таких операций, как отгонка паром.

Одним из самых простых и поэтому распространенных методов концентрирования является экстракция. Из-за высокой полярности аминов и гидразинов экстрагировать их непосредственно из водной фазы не удастся. Поэтому для аминов и гидразинов экстракция применяется исключительно после проведения реакций дериватизации. Степени концентрирования экстракции невелики, поэтому в сочетании с методами хроматографии, требующими небольшого объема вводимой пробы, применяется упаривание экстракта до минимального объема. Тем не менее, подход сочетания экстракции является трудоемким и малоэффективным.

Сорбция - альтернативный экстракции метод концентрирования. Сорбционное концентрирование обеспечивает хорошую избирательность разделения и высокие значения коэффициента концентрирования, оно более технологично, а для десорбции необходимы минимальные количества растворителей. При этом достигаются существенно более высокие коэффициенты концентрирования.

Сорбция, как и экстракция, достаточно проста и удобна в применении, но одним из главных ее преимуществ является легкость автоматизации. Возможно автоматизировать не только операцию концентрирования, но и полностью автоматизировать все определение в целом (*динамический вариант*), обеспечив

подачу концентрата в хроматографическую или проточно-инжекционную систему. Динамический вариант сорбции наиболее удобен: он не требует разделения фаз и позволяет автоматизировать весь цикл анализа, включая стадию пробоподготовки.

Сорбция по сравнению с экстракцией является более гибким способом концентрирования, поскольку в настоящее время обладает значительным арсеналом сорбентов, позволяющих выделять практически любые соединения по различным механизмам (адсорбция, абсорбция, ионный обмен, комплексообразование и др.). Сорбция допускает концентрирование как в виде непосредственно гидразинов, так и после получения производных.

В последние 20 лет интенсивно развиваются проточные методы анализа, включающие стадию «on-line» концентрирования, в том числе сорбционно-ВЭЖХ методы. При этом в циклическом режиме последовательно осуществляют концентрирование и определение. Эти методы, как правило, полностью автоматизированы и характеризуются высокой чувствительностью благодаря полному использованию концентрата (обычно на 1 – 2 порядка выше, чем те же методы без концентрирования), высокой производительностью, а также воспроизводимостью, обусловленной использованием замкнутых систем и точным дозированием растворов.

Наиболее подходящим методом для создания высокочувствительной сорбционно-хроматографической методики определения ультрамалых количеств НДМГ является жидкостная хроматография, которая, в отличие от газовой хроматографии, позволяет проводить концентрирование в on-line режиме и обеспечивает дополнительное повышение чувствительности за счет полного использования всего концентрата в ходе определения.

Для определения гидразинов методами жидкостной хроматографии и разработки сорбционно-хроматографической методики определения ультрамалых количеств НДМГ перспективны два варианта: ионная хроматография и ОФ ВЭЖХ. Гидразины недостаточно гидрофобны для использования обращенно-фазовой хроматографии без дериватизации, но при этом обладают кислотно-основными свойствами:  $pK^a$  этих соединений близок к 7. В кислой среде гидразины существуют в виде катионов, следовательно, при использовании элюентов с  $pH < 7$  НДМГ будет удерживаться катионообменниками, и это свойство можно

использовать для его определения методом ионной хроматографии. Особенно удачным сочетанием для определения гидразинов является применение ионохроматографического разделения и амперометрического детектирования. К достоинствам метода ионной хроматографии с амперометрическим детектированием (ИХ-АД) можно отнести высокую селективность и чувствительность. Кроме того, ионохроматографическое определение обычно хорошо стыкуется с динамическим on-line концентрированием, однако для определения НДМГ на уровне 10 нг/мл требуется 100-кратное концентрирование. Выбор условий предполагает: поиск сорбента для концентрирования, условий хроматографического определения и концентрирования, ограничений по составу пробы. Причем многие параметры взаимосвязаны, например, от применяемого элюента в хроматографии зависит разделение и чувствительность детектирования, и в то же время десорбция компонентов с сорбента в сорбционной части разрабатываемого подхода.

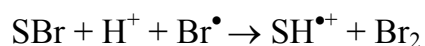
Высокую селективность определения веществ в природных объектах обеспечивает метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), также характеризующийся высокой чувствительностью при выборе подходящего типа детектирования, например, флуориметрического. Этот метод предполагает определение высокополярных соединений в виде их гидрофобных производных, следовательно, требует поиска эффективных дериватизирующих реагентов для модифицирования гидразинов и изучения сорбции образующихся производных. Для создания методики сорбционно-ВЭЖХ определения предстояло найти чувствительный реагент, позволяющий определять НДМГ на уровне ниже 1 мкг/л методом ВЭЖХ. Для этого найти условия дериватизации НДМГ, оценить возможность использования полученных производных для определения методом ВЭЖХ. Далее выявить возможность динамического сорбционного концентрирования полученных производных в off- и on-line вариантах. Выбрав условия сорбции-десорбции на гидрофобизованных силикагелях в off- режиме, найти условия сочетания динамического on-line концентрирования с ВЭЖХ определением.

На основании полученных данных разработать методику определения 5-1000 нг/мл НДМГ в природных водах, оценить ее правильность и воспроизводимость.

По направлению 3.6. календарного плана планировалась разработка методики определения пенициллиновых антибиотиков в пищевых продуктах, методики определения 1-нафтиламина в биологических жидкостях.

Для расширения круга органических соединений, определяемых кинетическими методами, и разработки чувствительных и селективных методик их определения, необходим выбор и исследование новых индикаторных реакций. Большинство используемых в кинетических методах индикаторных реакций – окислительно-восстановительные, протекающие по радикальному механизму, поэтому собственное влияние следовых количеств веществ в таких реакциях связано прежде всего с их взаимодействием с активными центрами цепного процесса. Если природа таких активных центров известна, то можно определить и круг потенциальных аналитов как соединений, могущих взаимодействовать с этими центрами. Информацию о том, какие именно классы органических соединений взаимодействуют с определенными радикалами, можно найти в литературе. Владение такой информацией позволяет проводить целенаправленный выбор систем: индикаторная реакция (с известным активным центром) – аналит (тип соединений). Такой предложенный нами подход позволяет создавать методики определения соединений, которые ранее не определяли кинетическими методами.

Для разработки аналитических методик в рамках данного направления целесообразно было использовать в качестве индикаторных реакций цепные процессы с известными механизмом и активными центрами. Удобны для реализации описываемого подхода, в частности, *реакции бромирования* в водном растворе, в которых непосредственным бромирующим агентом выступает бромноватистая кислота [121]. В качестве исходного бромирующего агента удобно использовать N-бромсукцинимид (НБС), который в водном растворе распадается по схеме ( $S^\bullet$  – радикал сукцинимида):



На скорость реакций этого типа могут влиять соединения, легко бромирующиеся и поэтому перехватывающие бромирующий агент: непредельные соединения, соединения серы(2–), ароматические соединения, способные

бромироваться в кольцо, и соединения, содержащие метиленовую группу в аллильном положении, в т. ч. бензильный заместитель, к которым принадлежат и производные бензилпенициллина.

Определение антибиотиков в молочных продуктах является актуальной задачей, поскольку соединения этого класса активно применяют в ветеринарии для лечения различных заболеваний крупного домашнего скота, в профилактических целях и как стимуляторы роста, в том числе нелегально. В то же время, попадание антибиотиков в пищевые продукты в течение длительного времени вызывает у человека аллергические реакции и стимулирует образование резистентных штаммов бактерий. Бензилпенициллин относится к числу наиболее часто используемых антибиотиков.

При разработке методики определения бензилпенициллина мы использовали в качестве восстановителя в предлагаемой реакции бромирования родамин 6Ж (Rhod). Первоначально предполагалось, что бромирование будет изменять способность родамина флуоресцировать, а производные пенициллина будут замедлять эту реакцию. Задачами работы был выбор условий, удобных для измерения скорости реакции, в том числе диапазонов концентраций Rhod и НБС, рН буферного раствора и длин волн возбуждения и регистрации флуоресценции.

Как упомянуто выше, ранее *хемилюминесцентные реакции* использовали в кинетических методах анализа ограниченно, а *фотохемилюминесцентные* – в единичных случаях. Это означает, что потенциал использования таких систем в анализе раскрыт далеко не полностью, хотя такие реакции могли бы обеспечить сочетание высокой чувствительности определения с высокой стабильностью аналитического сигнала, возбуждаемого постоянным, строго контролируемым физическим воздействием – излучением. В качестве подобной реакции нами предложена реакция автоокисления люминола, обычно выполняемая в хемилюминесцентном варианте. В таком варианте инициирование реакции происходит неконтролируемо, в нем большую роль играют примеси, присутствующие в растворе, в результате чего начальная скорость реакции и влияние на нее аналитов оказываются плохо воспроизводимыми. В фотохемилюминесцентном варианте данную реакцию иницирует излучение ксеноновой лампы того же спектрофлуориметра, в котором регистрируется

аналитический сигнал. Ожидалось, что аналитический сигнал в этом случае будет стабильным. Показать возможности данного подхода планировали путем разработки методики определения 1-нафтиламина.

2.2. Разработка лабораторных образцов ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот

В рамках работы получены мембранные *ион-селективные электроды (ИСЭ)* для определения фенолов, в частности, нитрофенолов (НФ; важные загрязнители окружающей среды).

Использовали ионную жидкость TOALS. Предварительно было показано, что данная ИЖ эффективно извлекает 4-НФ из водной фазы, мы предположили, что она хорошо себя проявит и в качестве активного компонента мембраны ИСЭ на нитрофенолы. Обладая высокой экстракционной способностью и находясь в мембране, она может свободно накапливать определяемый нитрофенолят-анион при кондиционировании, образуя электродноактивное соединение, и далее участвовать в ионообменных процессах между фазой мембраны и водным раствором, формируя потенциометрический отклик.

В связи с тем, что наличие электродного отклика определяется возможностью существования ионов определяемого соединения в растворе, а нитрофенолы, как известно, слабые кислоты, было проведено исследование зависимости потенциала электрода от кислотности исследуемого раствора.

Установлено, что электродный потенциал сильно зависит от pH раствора в строгом соответствии с величиной  $pK_a$ . С увеличением pH электрод реагирует на прирост концентрации нитрофенолят-анионов в растворе, и далее при  $pH > 9,5$  ( $pK_a + 2$ ) потенциал выходит на плато, что соответствует области, где доминирует анионная форма.

Исследование потенциометрического отклика ИСЭ на нитрофенолы проводили при  $pH \sim 10$ . Исследуемые мембраны проявляют воспроизводимый анионный отклик в растворах 4-НФ. Крутизна электродной функции выше

теоретической - 91,7 мВ/дек для TOALS;  $C_{\min}$  составляет  $3 \cdot 10^{-6}$  М, соответственно; время отклика ИСЭ не превышает 5-10 с даже в разбавленных растворах 4-НФ.

В растворах 2-, 3- нитрофенолов, а также 2,4-динитрофенола и пикриновой кислоты электроды также проявляют устойчивый анионный отклик с гипернернстовской крутизной электродной функции. Так для пикриновой кислоты (2,4,6-тринитрофенола) наклон электродной функции составил 108,2 мВ/дек.

Гипернернстовский отклик ИСЭ обычно связывают со сверхстехиометрическим поглощением мембраной определяемого иона, что возможно, учитывая экстракционные свойства ИЖ. Кроме того, наличие сверхтеоретического отклика может быть обусловлено и процессами необменной сорбции, когда в мембрану дополнительно экстрагируется значительное количество молекулярной формы нитрофенола. В результате этого вблизи поверхности электрода может возникнуть избыточная концентрация определяемого иона, что в свою очередь ведет к завышению наклона электродной функции.

Тем не менее, наличие воспроизводимого потенциометрического отклика на все нитрофенолы и низкие пределы обнаружения позволяют использовать исследуемые ИСЭ для определения нитрофенолов.

Изучена селективность потенциометрического отклика ИСЭ к 4-нитрофенолу в присутствии родственных соединений. Потенциометрические коэффициенты селективности ИСЭ к 4-НФ в присутствии моно-, ди- и тринитрофенолов определяли методом бионных потенциалов в растворах с концентрацией основного и мешающего иона  $1 \cdot 10^{-3}$  М.

Значения коэффициентов селективности хорошо коррелируют с гидрофобностью нитрофенолов. Так согласно литературным данным  $\log P_{NPOE/H_2O}$  уменьшается в ряду орто-(2-НФ), мета- (3-НФ) и паранитрофенол (4-НФ) [3]. Селективность мембраны соответствует этим данным. Действительно, на потенциометрический отклик к 4-НФ чуть больше влияет 2-НФ, чем более гидрофильный 3-НФ. Можно отметить, что эти различия в значениях потенциометрических коэффициентов селективности незначительны, и отклик к мононитрофенолам можно считать групповым.

Более значительное влияние на потенциометрический отклик к 4-НФ 2,4-динитрофенола и 2,4,6-тринитрофенола, очевидно, имеют ту же причину. Значения  $\log P_{NPOE/H_2O}$  для 4-НФ, 2,4-динитрофенола и 2,4,6-тринитрофенола свидетельствуют об увеличении гидрофобности в этом ряду.

Таким образом, предложенные ИСЭ на основе ИЖ TOALS могут быть использованы для группового определения моонитрофенолов. Малое время отклика, высокая чувствительность и воспроизводимость определения позволяют рекомендовать данные электроды в качестве детектирующих устройств после разделения нитрофенолов различными методами.

Нами также получены мембранные ион-селективные электроды (ИСЭ) для определения аминокислот.

Аминокислоты хорошо растворимы в воде, и, как правило, весьма гидрофильны. Сложность их определения заключается еще и в том, что в широком диапазоне  $pH$  данные соединения существуют в цвиттер-ионной форме, непригодной для ионометрического определения. Близость структур лауроилсаркозината – аниона ИЖ TOALS - и природных аминокислот обеспечивают возникновение ионообменных процессов и потенциометрического отклика на аминокислоты.

Предварительно нами показано наличие устойчивого отклика ИСЭ (жидкостной конструкции) на основе TOALS на анионную форму гидрофобных аминокислот, таких как фенилаланин, триптофан и аспарагин. Затем мы исследовали поведение твердотельного электрода, модифицированного TOALS, в растворах, следующих аминокислот: фенилаланина (Phe), триптофана (Trp) и глицина (Gly). Потенциометрический отклик изучали на серии ( $10^{-6} - 10^{-1}$ )М растворов аминокислот.

Обнаружено наличие анионного отклика, однако значения потенциала оказались неустойчивы, плохо воспроизводились, наклон электродной функции был гораздо ниже нернстовского.

Для улучшения электродных характеристик ИСЭ предварительно кондиционировали в растворе  $10^{-2}$  М  $CuSO_4$  в течение часа. Такой реагент был выбран не случайно. Для связывания карбоксильных групп аминокислоты обычно используют соединения со «встроенными» ионами металлов. Как показано нами,



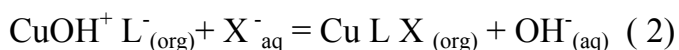
ИЖ TOALS хорошо экстрагирует из водных растворов ряд металлов:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ce}^{4+}$  и др. В связи с этим можно предположить, что при кондиционировании происходит образование металлокомплексного соединения ИЖ и меди непосредственно в мембране, а затем связывание карбоксильных групп аминокислоты. По-видимому, в состав комплекса входит анион N-лауроилсаркозината, а для компенсации заряда иона металла служит анион из водной фазы, в данном случае анион аминокислоты. Таким образом, предполагаемый состав комплекса -  $\text{CuLX}$ , где L - анион лауроилсаркозина, X - анион аминокислоты.

Можно предложить следующую схему формирования потенциометрического отклика:

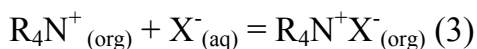
Стадия 1: Кондиционирование ИСЭ в растворе сульфата меди:



Стадия 2: Взаимодействие мембраны с аминокислотой



либо



Подобное строение комплекса на стадии (1) считается возможным, поскольку ИЖ (I) является достаточно полярной и сама содержит значительное количество растворенной воды. Поэтому допущение существования гидроксокомплекса в органической фазе представляется вероятным. Взаимодействие с аминокислотой может протекать по уравнениям 2 и 3.

Хотя строение и точный состав комплекса, полученного в условиях кондиционирования, еще не изучены, можно предположить, что происходит обмен лауроилсаркозината на анион аминокислоты (стадия 2), что и вызывает потенциометрический отклик. Такой процесс возможен в результате большей устойчивости образующегося комплекса металла с простой аминокислотой (исследуемый водный раствор) по сравнению с N-ацилированной (лауроилсаркозинат – Cu в мембране ИСЭ).

Потенциометрический отклик в растворах аминокислот при  $pH$  существования анионной формы фенилаланина, глицина и триптофана изучали с

ИСЭ после предварительного кондиционирования в растворе  $\text{CuSO}_4$ . Полученные результаты представлены в табл. 2 и на рис. 2 и 3.

Таблица 2 – Характеристики ИСЭ, модифицированного ИЖ TOALS в растворе Phe.

Характеристики	без кондиционирования	конд. в $\text{CuSO}_4$
S, мВ/дек	$-(26 \pm 2)$	$-(56 \pm 2)$
$C_{\min}$ , М	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$6,8 \cdot 10^{-5}$

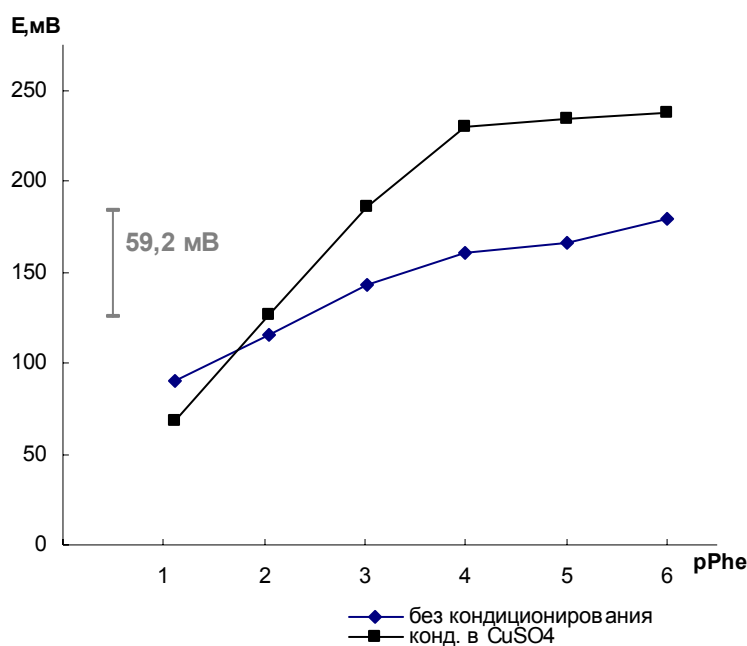


Рисунок 2 – Функция модифицированного электрода в растворе фенилаланина.

Сравнивая характеристики электрода в растворе фенилаланина до и после кондиционирования, можно отметить, что после кондиционирования предел обнаружения снизился на порядок, чувствительность возросла в два раза, и наклон электродной функции приблизился к нернстовскому.

В случае отклика на Gly характерен наклон ниже теоретического  $-(22 \pm 1)$  мВ/дек, высокий предел обнаружения, плохая воспроизводимость потенциала. Подобное поведение ИСЭ обусловлено гидрофильностью молекулы глицина. Поэтому обмен лауроилсаркозинат-иона на моноанион аминокислоты становится невыгодным.

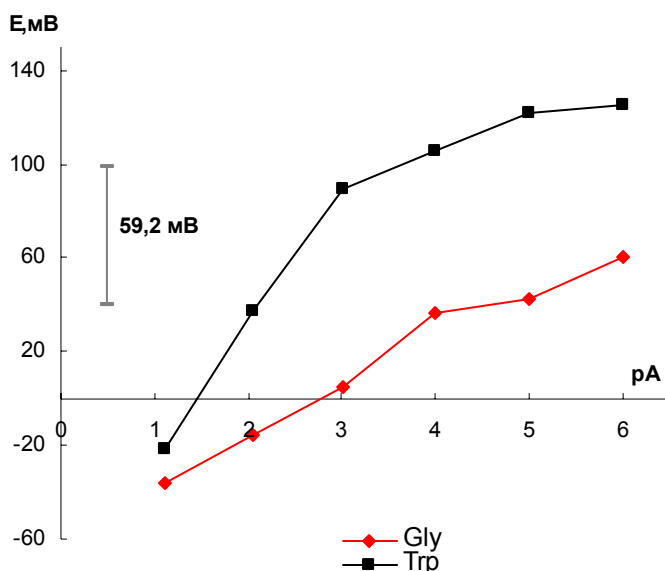


Рисунок 3 – Вид функций модифицированного ИЖ(I) электрода в растворах аминокислот: глицина и триптофана.

Для триптофана, более гидрофобного, чем фенилаланин, также наблюдается анионный потенциометрический отклик, однако зависимость потенциала от концентрации аниона аминокислоты линейна лишь в узкой области. Подобное явление может быть связано с необходимостью использовать при определении триптофана более щелочные растворы ( $pK_{a2}=9,4$ ;  $pH \sim 11,5$ ), что может сказаться на всех сложных равновесиях, описанных выше. Кроме того, не исключено, что столь высокая концентрация ионов гидроксила оказывает влияние и на мембранный потенциал ИСЭ. Причем при малых концентрациях триптофана в сильнощелочной среде это слияние сильнее, что приводит к искажению отклика электрода на анион триптофана.

Таким образом, наилучший отклик твердотельная мембрана проявляет к фенилаланину при оптимальном значении  $pH$ .

*Оптимизация модифицированного электрода.* К сожалению, предложенный электрод на фенилаланин оказался недолговечен. Эксплуатационный ресурс составляет 8-9 – дней. Все это время электрод проявляет стабильные электрохимические характеристики. Затем наблюдается ухудшение потенциометрического отклика, что, возможно, связано с частичным вымыванием ИЖ (I) с поверхности электрода.

С целью продления срока службы электрода было решено использовать в качестве матрицы более тугоплавкую ИЖ DHDImBr – бромид 1,3-дигексадецил-имидазолия с температурой плавления 96<sup>0</sup>С. Данная ИЖ не проявляет потенциометрического отклика к фенилаланину. Расплавленную смесь двух ИЖ в соотношениях 1:1, 1:4, 1:9 наносили на индикаторную поверхность электрода. После полного застывания полученные датчики кондиционировали в растворе CuSO<sub>4</sub>. Все приготовленные ИСЭ был использованы для измерения потенциала в растворе Phe. Результаты представлены на рис. 4 и в таблице 3.

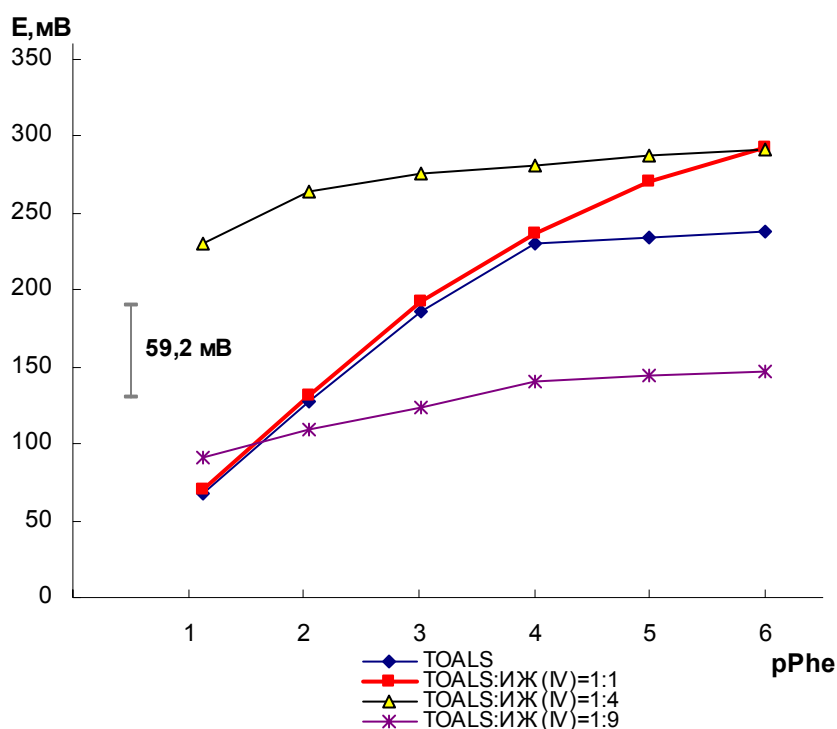


Рисунок 4 – Функции модифицированного электрода в растворе анионной формы фенилаланина.

По представленным данным видно, что наилучшие характеристики электрода достигаются при соотношении TOALS: DHDIMBR равному 1:1. При остальных пропорциях наблюдается либо снижение предела обнаружения, либо уменьшение чувствительности определения и повышение времени отклика. Вероятно, это является следствием того, что полученные электроды содержат недостаточное количество TOALS, обеспечивающей связывание аналита в мембране, что мешает проявлению хорошего анионного отклика. При оптимальном соотношении двух ИЖ в мембранной композиции полученный датчик обладает близкой к теоретической крутизной электродной функции, низким пределом обнаружения и

малым временем отклика. Весьма важным свойством данного электрода является увеличение эксплуатационного ресурса. Продолжительность службы модифицированного электрода составляет не менее 3-6 месяцев. В настоящее время датчик имеет прежние характеристики.

Таблица 3 – Характеристики ИСЭ, модифицированных смесью TOALS-DHDI<sub>m</sub>Br в различных соотношениях.

Характеристики	Варианты модификаций TOALS-DHDI <sub>m</sub> Br			
	только TOALS	1:1	1:4	1:9
S, мВ/дек	-(56±2)	-58,2	-26,5	-17,6
C <sub>min</sub> , М	6,8•10 <sup>-5</sup>	2,7•10 <sup>-5</sup>	4,5•10 <sup>-4</sup>	7,0•10 <sup>-4</sup>
интервал линейности, М	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-4</sup>	-	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-4</sup>
время отклика, с	15	15	25	30

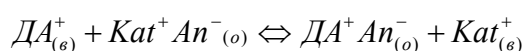
Отметим, что в работе впервые показана возможность одновременного использования двух ионных жидкостей для получения миниатюрного планарного твердотельного ИСЭ. При этом одна ИЖ выступает в роли инертной матрицы, в которой иммобилизована вторая ИЖ, обеспечивающая связывание аналита и формирование потенциометрического отклика.

Значительное внимание в рамках работы уделено разработке *электродов для вольтамперометрического определения катехоламинов.*

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.

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, 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 (≈ 0,5 мг ИЖ). Электроды отличает миниатюрность (10 x 28 мм), дешевизна и доступность.

В рамках выполненной работы нами изучено окисление природных (адреналин, допамин) и синтетических (добутамин) катехоламинов на модифицированных планарных электродах в режиме циклической вольтамперометрии и установлено, что процесс окисления необратим, скоростьопределяющей стадией является диффузия деполяризатора. Обнаружено,

что предварительное накопление катехоламинов при нулевом потенциале приводит к существенному увеличению аналитического сигнала.

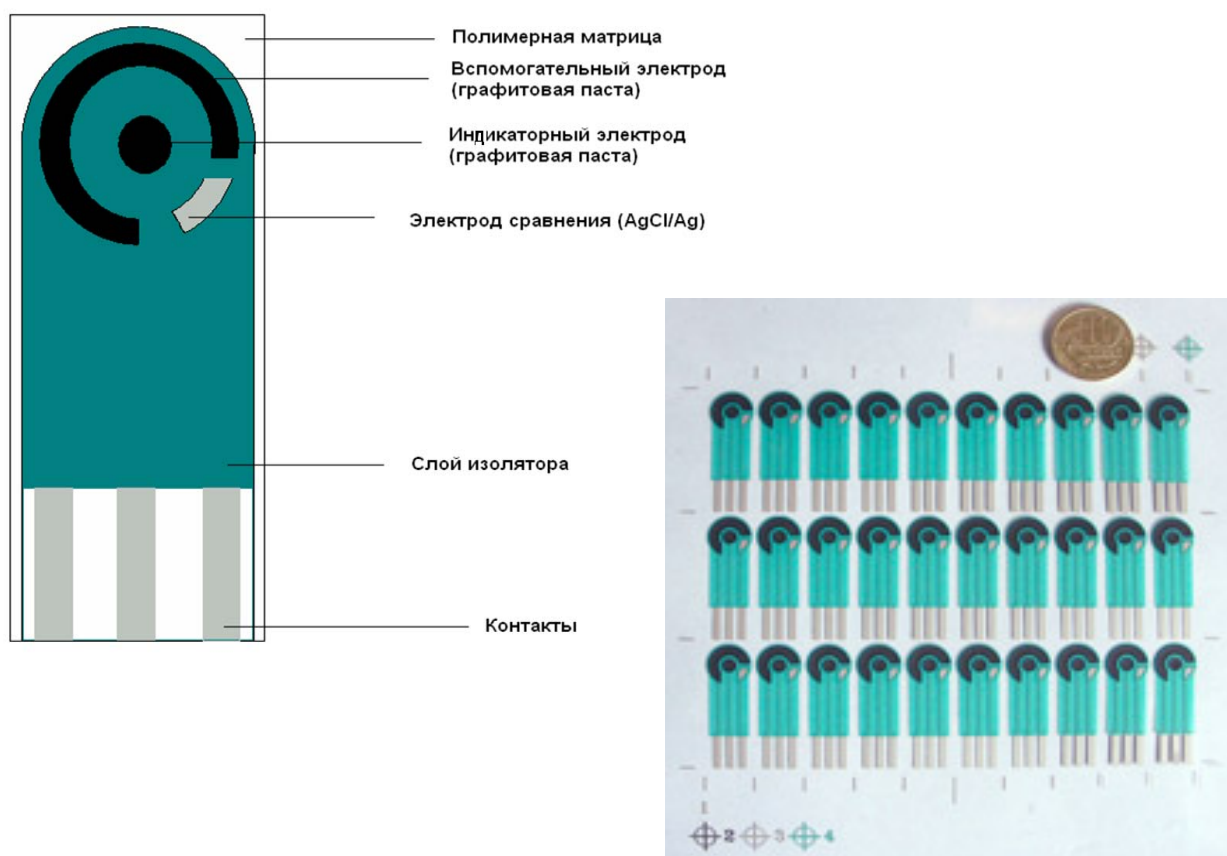
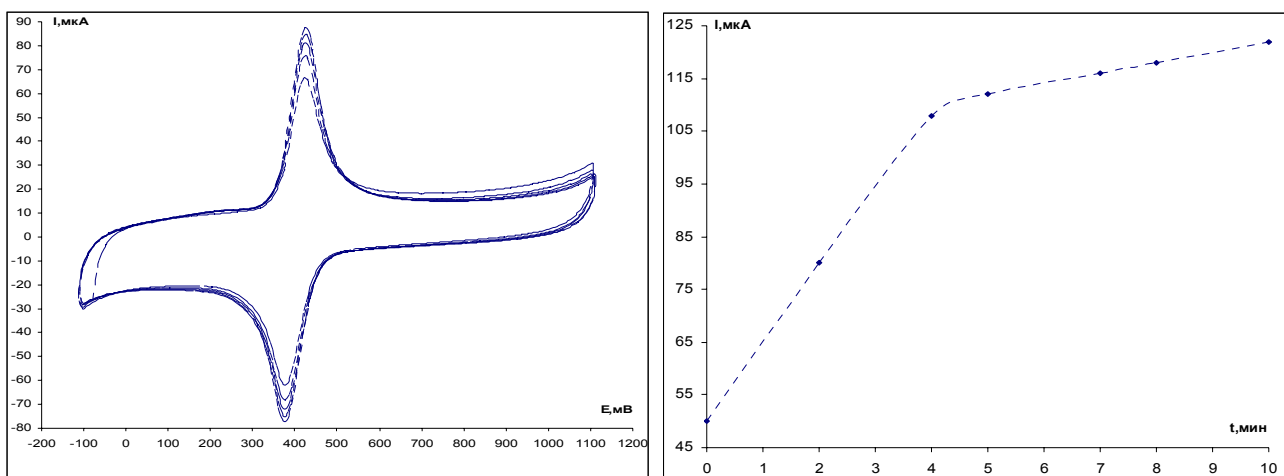


Рисунок 5 – Конструкция модифицированных печатных электродов.

Установлено, что окисление  $1,0 \cdot 10^{-3}$  М допамина на планарном электроде конструкции «3 в 1» при pH=2 (фон 0,01 М  $H_2SO_4$ +0,01 М 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. 6а).

Установлено, что окисление катехоламинов (адреналина, допамина, добутамина) на модифицированных электродах протекает необратимо,

скоростьюопределяющей стадией является диффузия деполаризатора. Найдено, что предварительное накопление аналита в слое модификатора при нулевом потенциале приводит к существенному увеличению аналитического сигнала.



**а**

**б**

Рисунок 6. Вольтамперограммы окисления  $1 \cdot 10^{-3}$  М допамина на планарном электроде, модифицированном пастой состава «графит:BDMImTf<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/с.

Очевидно, протекает экстракция протонированных форм катехоламинов в ИЖ по катионообменному механизму. Установлено, что оптимальное время накопления аналита составляет 4 минуты (Рис. 6б), что было использовано при построении концентрационной зависимости для допамина и других катехоламинов.

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

Исследовали ИЖ различной природы - BMImPF<sub>6</sub>, BMImTf<sub>2</sub>N и BDMImTf<sub>2</sub>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 BMImPF<sub>6</sub> ограничены её растворимостью в воде – электроды, модифицированные пастой на основе BMImPF<sub>6</sub>, 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 Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup> также снижает вязкость ИЖ, что позволяет ускорить процесс накопления аналита в слое модификатора. Наиболее эффективно использовать BDMImTf<sub>2</sub>N.

Подобраны оптимальные условия определения катехоламинов.

Установлено, что введение тетракис-трет-бутилзамещенного фталоцианина Co (III) в состав модифицирующей пасты приводит к существенному увеличению аналитического сигнала (рис. 7); на примере допамина показана возможность определения в широком интервале концентраций,  $C_{\min} = (6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$  М.

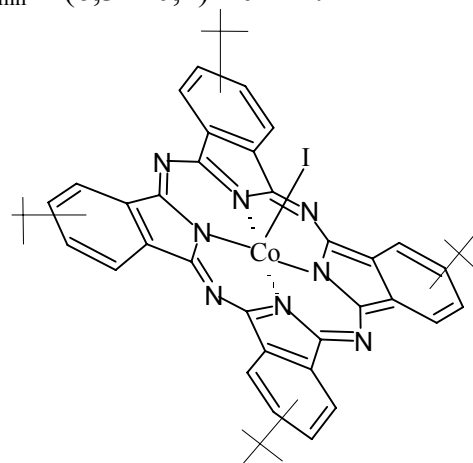
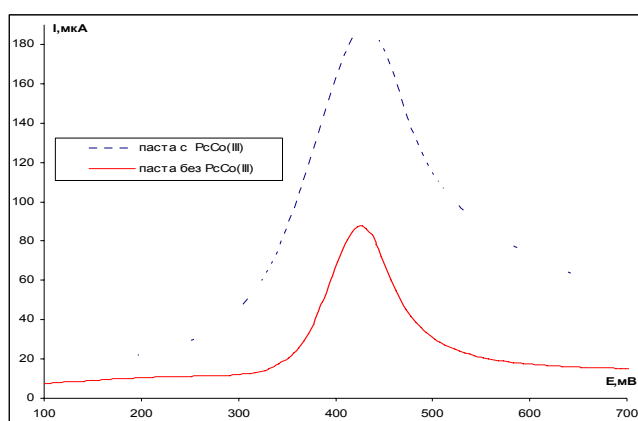


Рисунок 7 – Увеличение тока окисления  $1 \cdot 10^{-3}$  М допамина при введении в состав пасты 0,08% Pc<sup>+</sup>CoI (фон 0,01М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0,01М KCl; накопление 4 минуты; V=100 мВ/с).

Показано, что введение катионообменника Nafion в модифицирующую композицию улучшает эксплуатационные свойства электрода и позволяет определять катехоламины в присутствии 100-кратного избытка аскорбиновой кислоты.

В целом, пределы обнаружения катехоламинов находятся на уровне  $10^{-7}$  -  $10^{-8}$  М, эксплуатационный ресурс – не менее 3-6 месяцев.

Метрологические характеристики методик определения катехоламинов при помощи электрода на основе ИЖ BDMImTf<sub>2</sub>N и Nafion приведены в табл. 4.

Таблица 4 – Определение катехоламинов на электроде, модифицированном пастой на основе BDMImTf<sub>2</sub>N+Nafion. Фон 0,01M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01M KCl; V=100 мВ/сек (P=0,95; n=3).

Катехоламин	Диапазон линейности, (M)	C <sub>min</sub> ; 10 <sup>-7</sup> M
Адреналин	2,9·10 <sup>-7</sup> -1,0·10 <sup>-4</sup>	1,31±0,06
Допамин	6,1·10 <sup>-7</sup> -1,0·10 <sup>-4</sup>	4,72±0,08
Добутамин	1,7·10 <sup>-7</sup> -1,0·10 <sup>-4</sup>	0,81±0,05

Планарный электрод, модифицированный BDMImTf<sub>2</sub>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).

Таким образом, разработаны 4 лабораторных образца (в ТЗ – 4 лабораторных образца) ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения не ниже 10<sup>-5</sup> M (в ТЗ – не ниже 10<sup>-5</sup> M), время отклика электродов не более 1 мин (в ТЗ – не более 1 мин), эксплуатационный ресурс – не менее 3-6 месяцев (в ТЗ – не менее 3-6 месяцев).

2.3. Разработка лабораторных образцов биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе боэлектрокатализа ферментами гидрогеназами.

*Изучение механизма прямого биоэлектрокатализа гидрогеназами из разных микроорганизмов.* При помещении электрода с иммобилизованной гидрогеназой в электрохимическую ячейку, продуваемую водородом наблюдается постепенное снижение потенциала разомкнутой цепи до нуля относительно потенциала платины покрытой платиновой чернью в атмосфере водорода в том же растворе (ОВЭ). Этот процесс называется активацией и обусловлен переходом фермента из неактивной формы в активную. Пример активации представлен на рис. 8. При этом вне зависимости от выбранного метода иммобилизации мы наблюдаем волну,

разделяющую этот процесс на три этапа: два медленных (с 0 по 40 секунды и с 60 секунды на рис. 8) и быстрый (с 40 по 60 секунды на рис. 8).

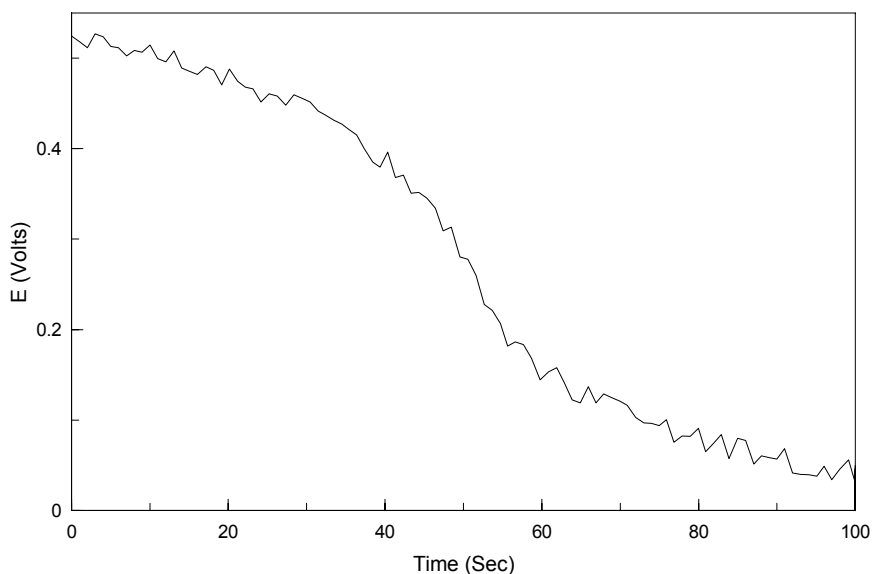


Рисунок 8 – Активация электродов на основе ткани ЛШГ с иммобилизованной гидрогеназой из *T. roseopersicina* в атмосфере водорода (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7, 25°C)

Ранее в нашей лаборатории был разработан метод получения высокоактивных гидрогеназных электродов на основе углеродной ткани, модифицированной виологен содержащим производным полипиррола, с использованием гидрогеназ из *T. roseopersicina* и *D. baculatum*. При положительных перенапряжениях в атмосфере водорода наблюдались значительные токи окисления водорода. Было показано, что при перенапряжениях, превышающих 200 мВ, наблюдается снижение активности электродов, предположительно из-за восстановительной инактивации. Поэтому, если не указано особо, за максимальный ток принимали значение при перенапряжении 200 мВ.

Известно, что ферменты, выполняющие одни те же функции, но выделенные из разных микроорганизмов могут разительно отличаться друг от друга по своим свойствам. Поэтому использование гидрогеназ из различных источников является одним из путей улучшения характеристик ферментных электродов.

Гидрогеназа из *L. modestohalophilus* была впервые выделена в 2003 году сотрудниками НИИ Фундаментальных проблем биологии (г. Пущино). Для

исследования использовались два препарата фермента, отличающиеся степенью очистки. Гомогенный препарат гидрогеназы был дополнительно очищен при помощи электрофореза. При этом удаляется закрывающий дистальный железосерный кластер цитохром слабо связанный с белком.

Гидрогеназа была иммобилизована на поверхности гидрофилизованной ткани ТВШ и ткани ЛШГ, модифицированной полипиррол-виологеном. Для всех типов электродов наблюдается более высокая электрохимическая активность в случае гомогенного препарата. Активность биоэлектродокатализ на гидрофилизованной ткани крайне низкая.

Таблица 5 – Характеристики ферментных электродов различных типов с гидрогеназой из *L. modestohalophilus* (0,05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,1 М КСl, рН 7, 25°С).

Препарат гидрогеназы	метод иммобилизации	Е <sub>0</sub> , мВ	I <sub>макс.</sub> , мкА/см <sup>2</sup>
<i>L. modestohalophilus</i>	прямой биоэлектродокатализ (гидрофилизованная ткань)	115	8
	дизайн поверхности ткани полипиррол-виологеном	10	750
<i>L. modestohalophilus</i> , гомогенный	прямой биоэлектродокатализ (гидрофилизованная ткань)	75	15
	дизайн поверхности ткани полипиррол-виологеном	-6	1250

Таким образом, впервые продемонстрирован высокоэффективный биоэлектродокатализ гидрогеназой из *L. modestohalophilus*. Показано значительное увеличение активности электродов при использовании фермента после дополнительной стадии очистки.

Гидрогеназа из *D. baculatum* является цитоплазматическим белком и не связана прочно с цитохромом С<sub>3</sub>, что позволяет отделять цитохром от фермента даже при помощи хроматографических методов очистки. В то же время гидрогеназа из *T. roseopersicina* – мембрансвязанный фермент, также как и

гидрогеназа из *L. modestohalophilus*. Они прочно связаны с цитохромом, который блокирует туннелирование электрона от дистального железо-серного кластера на электрод. Отделить цитохром от этих ферментов удастся только при помощи электрофореза. Было изучено влияние наличия дополнительной стадии очистки фермента методом электрофореза для удаления цитохрома и концентрации гидрогеназы в растворе при адсорбции на характеристики электродов, покрытых полипиррол-виологеном. На рис. 9 представлены зависимости максимального тока окисления водорода от концентрации фермента в растворе для пяти образцов ферментов.

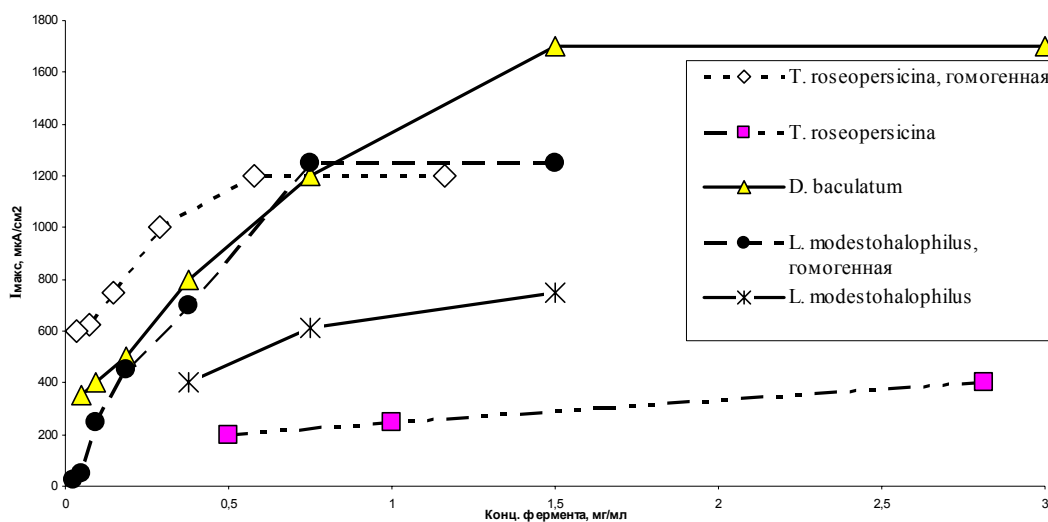


Рисунок 9 – Влияние концентраций гидрогеназ из различных источников в адсорбционном растворе на характеристики водородных ферментных электродов на основе графитовой ткани, модифицированной полипиррол-виологеном (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7, 25°C).

В случае гомогенных препаратов из *T. roseopersicina* и *L. modestohalophilus* наблюдается быстрый выход на максимум тока окисления водорода при увеличении концентрации гидрогеназы с выходом на плато при концентрации более 1 мг/мл. Для не гомогенных препаратов достигаемые значения тока окисления водорода значительно ниже и продолжают расти даже при концентрации 3 и 1,5 мг/мл соответственно. Таким образом, оптимальной концентрацией фермента в адсорбционном растворе для гомогенных препаратов *T.*

*roseopersicina* и *L. modestohalophilus* является 0,75-1 мг/мл. Для *D. baculatum* оптимальной концентрацией является 1,5 мг/мл.

В последующих экспериментах, если не указано отдельно, использовали для сорбции фермента растворы с концентрациями гидрогеназ 1 мг/мл для *L. modestohalophilus* и *T. roseopersicina* и 1,5 мг/мл фермента для *D. baculatum*.

Поляризационные кривые для ферментных электродов с гидрогеназами из *L. modestohalophilus* и *T. roseopersicina* при оптимальных условиях представлены на рис. 10. Ток в катодной области обусловлен обратной реакцией – выделения водорода.

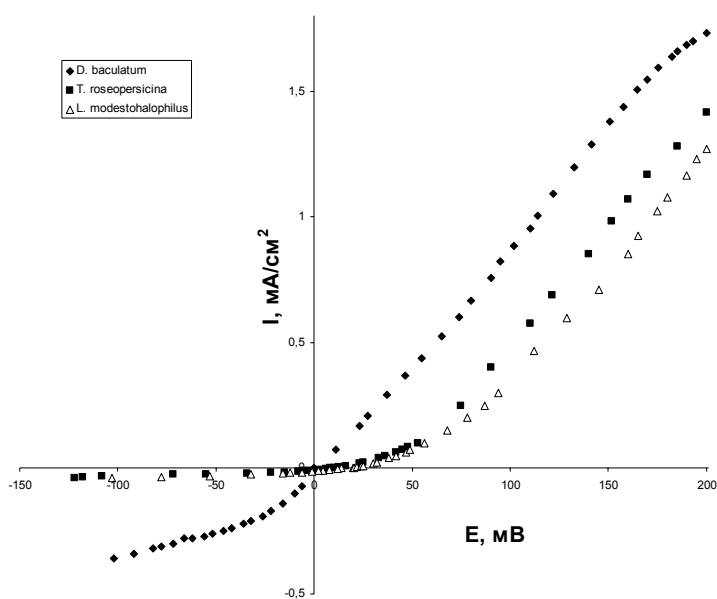


Рисунок 10 – Поляризационные кривые электроокисления водорода на электроде из ткани ЛШГ, модифицированной полипиррол-виологеном с иммобилизованными гидрогеназами из различных источников (0,05 М КН<sub>2</sub>Р<sub>0</sub><sub>4</sub>, 0,1 М КС<sub>1</sub>, рН 7, 25°С).

*Повышение эффективности биоэлектrocатализа гидрогеназами за счет использования модификации электродов замещенными полианилинами.* Использование проводящих полимеров для модификации поверхности ферментных электродов позволяет увеличить эффективность биоэлектrocатализа. При этом наилучших результатов удается достичь в том случае, если полимер в своем составе содержит заместители, являющиеся субстратом фермента. Так нами

ранее было показано, что использование для предварительной модификации поверхности водородного гидрогеназного электрода полимерных пирролов, содержащих в своем составе звенья виологена, являющегося одним из лучших субстратов для гидрогеназы, позволило увеличить эффективность биоэлектрокатализа гидрогеназами по сравнению с гидрогеназными электродами с непродобработанной поверхностью в 7-9 раз. В связи с этим интерес вызывает изучение других проводящих полимеров, замещенных субстратом, например, анилина.

В лаборатории проводящих полимеров Института нефтехимического синтеза им. Гопчиева РАН был синтезирован мономер анилина, замещенного виологеном, N,N'-бис(5-анилинопентил)-4,4'-бипиридил (AB) (рис. 11).

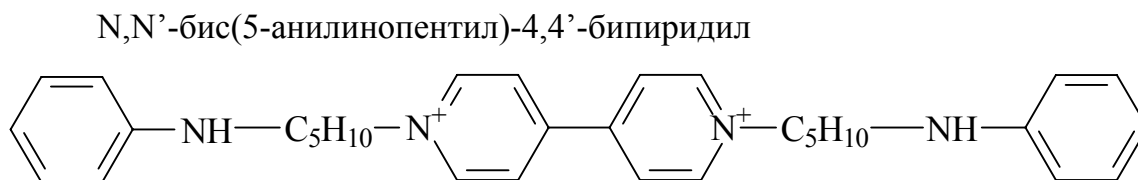


Рис. 11. Структуры соединений, использованные в работе.

В работе исследованы две схемы синтеза полимерного покрытия на поверхности электрода на основе данного АВ. Первая заключалась в проведении стадии электрополимеризации АВ. Согласно второй схеме синтез слоя полимера проводился методом пограничной полимеризации. Основным преимуществом пограничной полимеризации анилина перед электрополимеризацией должна стать простота методики синтеза, отсутствие трудоемкой стадии электрополимеризации, простота приборного оформления синтеза и возможность модификации дисперсных материалов. Электрополимеризация же позволяет получать воспроизводимую поверхность, точно контролировать толщину слоя получаемого полимера, анализировать полученный полимер.

*Приготовление ферментных электродов электрополимеризацией анилина.* Было показано, что АВ электрохимически не полимеризуется, поэтому было целесообразно проводить синтез слоя полимера на поверхности электрода сополимеризацией АВ с анилином.

Проводили синтез полимера сополимеризацией анилина и АВ в соотношениях 100:0, 85:15 и 50:50 по массе. На рисунках 12 и 13 приведены циклические вольтамперограммы роста сополимера в соотношениях 75:15 и 50:50.

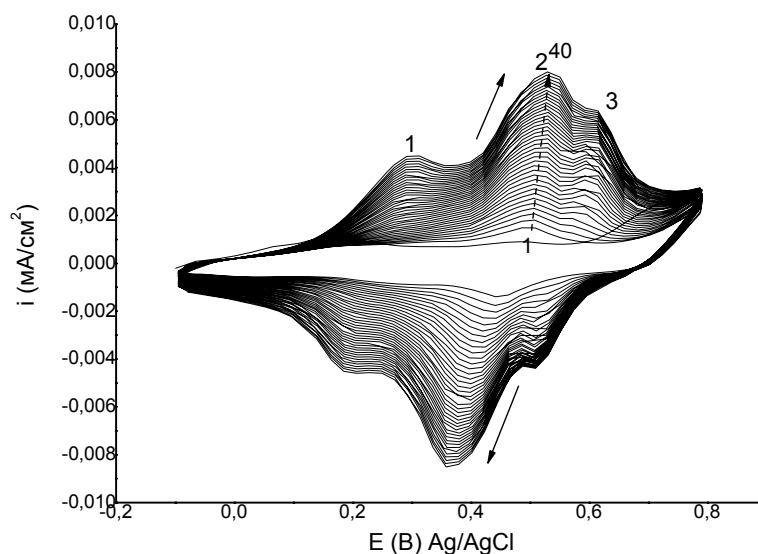


Рисунок 12 – Циклическая вольтамперограмма роста сополимера анилина и АВ в соотношении 50:50 на графитизированной ткани ЛШГ-240, скорость циклирования 50 мВ/с (0,5 М  $H_2SO_4$ , 25°C, конц. смеси 0,1 М).

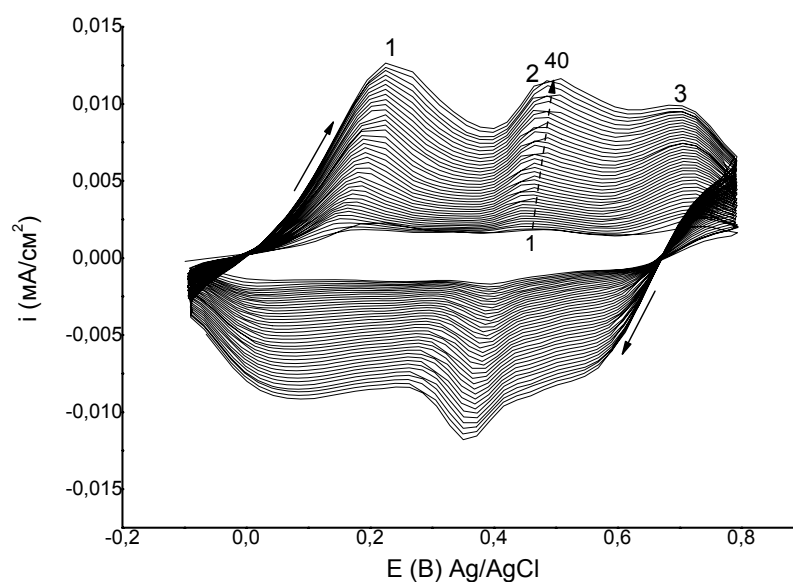
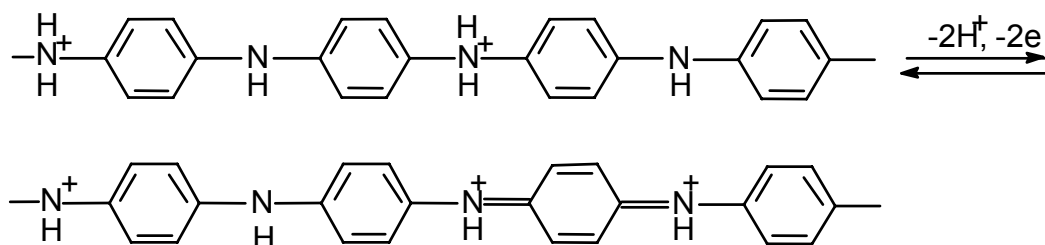


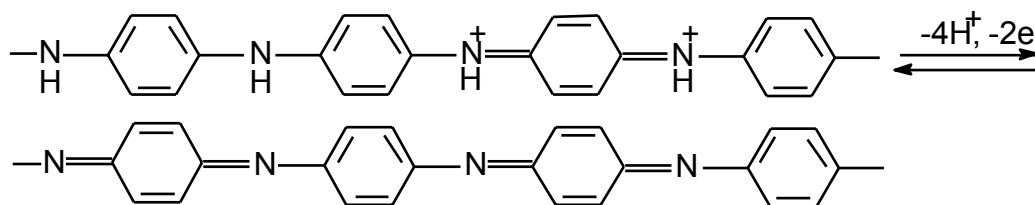
Рисунок 13 – Циклическая вольтамперограмма роста сополимера анилина и АВ в соотношении 85:15 на графитизированной ткани ЛШГ-240, скорость циклирования 50 мВ/с (0,5 М  $H_2SO_4$ , 25°C, конц. смеси 0,1 М).



На каждой из циклических вольтамперограммах хорошо видны три пары пиков. Анодная пара пиков (1 на рис. 12 и 13) соответствует переходу от наиболее восстановленного состояния полианилина, называемого лейкоэмеральдином, к эмеральдину, и в кислой среде ( $1 < \text{pH} < 4$ ) этот переход может быть записан так:



Катодная пара пиков (3 на рис. 6 и 7)- окислительно-восстановительная реакция полианилина - переход от эмеральдина к пернигранилину, уравнение:



При этом с увеличением концентрации АВ в ростовом растворе сильно увеличивается средний пик (2 на рис. 12 и 13), который относится к превращениям дефектов в линейной структуре полимера. Связано это с тем, что при увеличении концентрации АВ, все больше его включается в структуру полимера и тем больше дефектов возникает из-за наличия большого заместителя. Таким образом, изменение соотношения реагентов в ростовом растворе меняет их соотношение в получаемом полимере.

Были получены ферментные электроды с поверхностью, модифицированной сополимерами анилина и АВ в разных соотношениях. Оптимизировалась так же и толщина полимерного покрытия, которая изменялась за счет разного количества циклов при циклировании электрода в ростовом растворе. Зависимость токовых характеристик водородных гидрогеназных электродов от содержания АВ (по массе) в смеси анилина и АВ и количества циклов представлена на диаграмме (рис. 14).

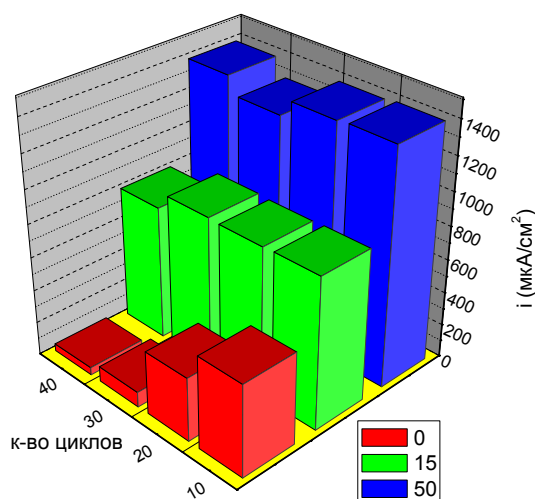


Рисунок 14 – Влияние содержания АВ в смеси и количества циклов при полимеризации на плотность тока при потенциале 200 мВ на ферментных электродах с полимеризованными сополимерами анилина и АВ.

Из представленной диаграммы видно, что эффективность биоэлектрокатализа ферментными электродами повышается с увеличением процента АВ в ростовом растворе и снижается, при увеличении толщины слоя вследствие увеличения количества циклов при электрополимеризации. Особенно заметно эффект снижения активности гидрогеназных электродов наблюдается при гомополимеризации анилина. По-видимому, это связано с тем, что в условиях измерения (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , рН 7, 25°C) полианилин обладает низкой проводимостью и экранирует поверхность электрода. При добавлении в структуру полимера групп ред/окс активных при данном потенциале проводимость слоя полимера резко возрастает из-за переноса заряда по данным группам.

Лучший по своим электрокаталитическим характеристикам электрод был получен при соотношении массы анилина и АВ в ростовом растворе 50:50 и толщине слоя, соответствующем 10 циклам при электрополимеризации. На рис. 15 приводятся сравнения поляризационных кривых для лучших гидрогеназных электродов, полученных методами предварительной модификации поверхности проводящим полипирролом, замещенным виологеном (ППВ), сополимером анилина и АВ и ферментного электрода с непродобработанной поверхностью.

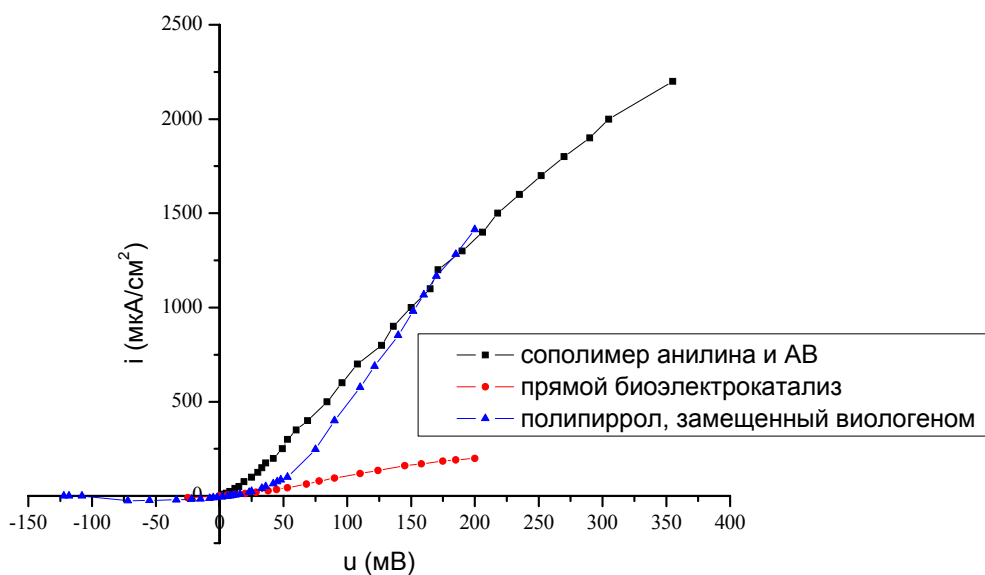


Рисунок 15 – Поляризационные кривые окисления водорода в атмосфере водорода на электродах, полученных методами модификации поверхности проводящим полипирролом, замещенным виологеном, сополимером анилина и АВ и электрода с непродобработанной поверхностью (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7,  $25^\circ\text{C}$ ).

Ферментный электрод, методика получения которого включал в себя стадию сополимеризации анилина и АВ, превосходит аналогичный, модифицированный ППВ, практически во всей области потенциалов. Особенно разница оказывается заметна при низких потенциалах. При 50 мВ плотность тока окисления водорода на гидрогеназном электроде, предобработанного сополимером анилина и АВ, оказывается в 4 раза больше, чем на ферментном электроде с ППВ. Область потенциалов, в которой электрод оказывается стабильным, была расширена до потенциалов 320 – 350 мВ.

Таким образом, используя методику приготовления ферментных электродов электрополимеризацией анилина, замещенного субстратом, удастся получить высокоактивные водородные ферментные электроды. Самую высокую активность показывают электроды, методика получения которых включала стадию сополимеризации анилина и АВ в соотношении 50:50 по массе. Плотность тока на данном электроде при потенциале 200 мВ составила  $1400 \text{ мкА/см}^2$ , максимальный ток – 2200 мкА при потенциале 350 мВ.

Предобработка поверхности ферментных электродов с использованием метода пограничной полимеризации анилина. Методы дизайна поверхности ферментных электродов проводящими полимерами при помощи электрохимической полимеризации при всех своих достоинствах, обладает рядом недостатков, таких как необходимость сложного аппаратного обеспечения, трудности при производстве электродов больших размеров. Для замены стадии электрохимического синтеза подложки из проводящего полимера, предлагается использовать метод пограничной полимеризации. К достоинствам данного метода полимеризации можно отнести тот факт, что реакцию можно проводить, не используя каких либо дополнительных приборов, и размеры получаемого электрода ограничены лишь объемом емкости реактора. Принцип синтеза полианилина методом пограничной полимеризации основан на разных скоростях реакции полимеризации в растворе и на поверхности графитового электрода. Реакция в растворе протекает медленно, в то время как на границе раздела фаз ее скорость резко возрастает за счет адсорбции реагентов.

Совместно с лабораторией проводящих полимеров Института нефтехимического синтеза им. Топчиева РАН была создана серия из 97 образцов ферментных электродов на основе препарата гидрогеназы из *T. roseopersicina* и N,N'-бис(5-анилинопентил)-4,4'-бипиридил (AB). Варьировали различные параметры, оптимальные значения варьируемых параметров приведены в таблице:

Таблица 6 – Оптимизация параметров реакции пограничной полимеризации AB при синтезе водородных ферментных электродов

Варьируемый параметр	Оптимальное значение
Соотношение окислитель/AB	1.5
Концентрация AB	0.05M
Тип ткани	ЛШГ-240
Концентрация кислоты	0.5M
Способ нейтрализации	Вода

Поляризационная кривая электрода с наилучшими электрокаталитическими характеристиками, полученными в условиях, приведенных в табл. 6, представлена на рис. 16.

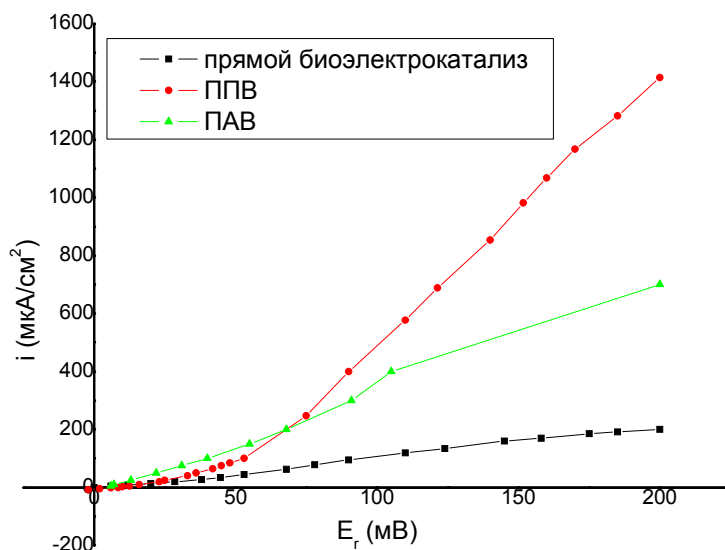


Рисунок 16 – Поляризационные кривые окисления водорода в атмосфере водорода на электроде, модифицированном полианилина, замещенного виологеном (ПАВ), полученном методом пограничной полимеризации, модифицированном полипирролом, замещенным виологеном (ППВ) и электроде с непродобработанной поверхностью (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7, 25°C).

Как видно из представленного рисунка, водородный электрод, промежуточно модифицированный ПАВ, значительно превосходит во всей области рабочих потенциалов ферментный электрод функционирующий по принципу прямого биоэлектрокатализа. В области высоких потенциалов водородный электрод, полученным методом пограничной полимеризации АВ, уступает аналогичному электроду с электрополимеризованным ППВ по эффективности биоэлектрокатализа, однако, превосходит его в области потенциалов до 75 мВ, что свидетельствует о увеличении эффективностей биоэлектрокатализа в данной области потенциалов и приближении к диффузионно контролируемому пределу скорости реакции. Это особенно важно, если речь идет о работе электрода в условиях низких плотностей тока.

Таким образом, впервые используя методику приготовления ферментных электродов пограничной полимеризацией АВ с последующей сорбцией фермента, удается получить высокоактивные водородные ферментные электроды. Плотность тока при потенциале 200 мВ составила 700 мкА/см<sup>2</sup>.

*Повышение эффективности биоэлектрокатализа гидрогеназами за счет использования модификации электродов полимерными азинами.* Как было показано ранее на примере производных полипиррола, в частности поли-N-метил-N'-(12-пиррол-1-илдодецил)-4,4'-бипиридина (ППВ), наличие на поверхности положительно заряженного полимера, в структуре которого присутствуют заместители, являющиеся субстратом для гидрогеназы, позволяет увеличить эффективность биоэлектрокатализа. Из литературы известно, что некоторые азины, являющиеся субстратами для гидрогеназы способны полимеризоваться с образованием положительно заряженных слоёв на поверхности электрода. Нами был выбран азиновый краситель нейтральный красный, который способен электрополимеризоваться на графитных электродах с образованием положительно заряженного слоя полимера, поскольку он является субстратом гидрогеназы и область его электроактивности близка к равновесному водородному.

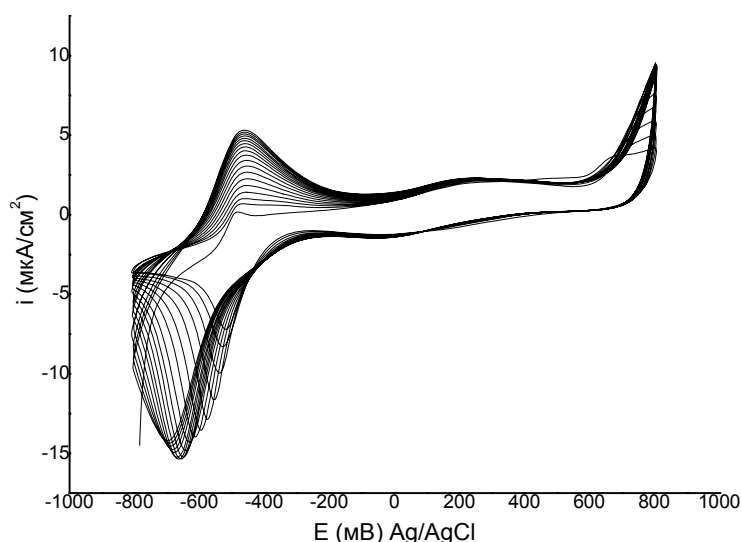


Рисунок 17 – Циклическая вольтамперограмма роста электрополимеризованного нейтрального красного на графитизированной ткани ЛШГ-240, скорость циклирования 50 мВ/с (0,25 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,1 М NaNO<sub>3</sub>, рН 6, 25°С).

На данной циклической вольтамперограмме (рис. 17) при высоких анодных потенциалах виден пик необратимого окисления нейтрального красного, а в области потенциалов от -0.8 до 0.4 В видны две растущие пары пиков обратимых окислительно-восстановительных процессов. Причем катодная пара пиков приходится на область потенциалов от -0.8 до -0.2, в эту область попадает равновесный водородный потенциал (-0.635 при pH 7 и 25°C).

Для создания электрода с наилучшими электрокаталитическими свойствами, варьировали количество циклов при электрополимеризации и, как следствие, толщину слоя полимера на поверхности электрода с целью определения оптимума. Были синтезированы электроды с полимерным покрытием из электрополимеризованного нейтрального красного разной толщины, которая менялась за счет увеличения количества циклов при электрополимеризации от 5 до 30 с шагом в 5 циклов. Поляризационные кривые данных электродов представлены на рис. 18.

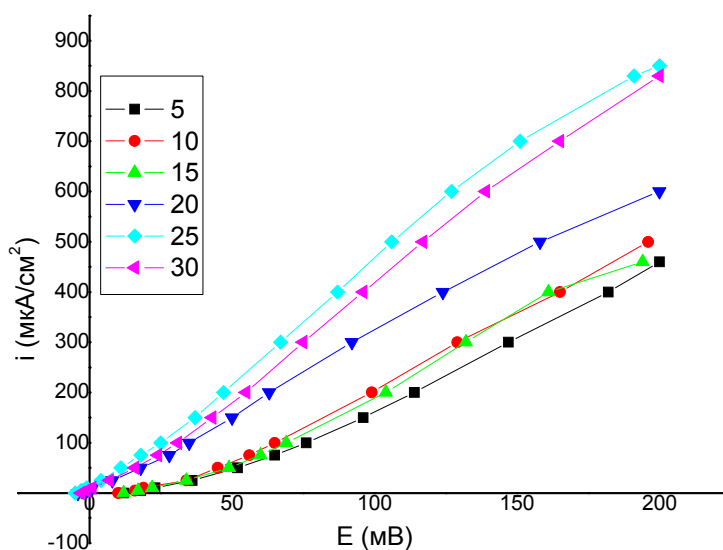


Рисунок 18 – Поляризационные кривые окисления водорода в атмосфере водорода на электродах, модифицированных слоем полинейтрального красного разной толщины (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7, 25°C).

Изучено влияние толщины слоя электрополимеризованного нейтрального красного на величину плотности тока окисления водорода на гидрогеназном электроде при потенциале 200 мВ (рис. 19).

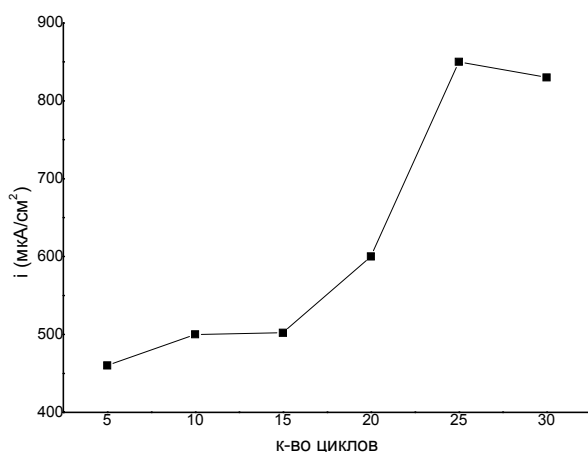


Рисунок 19 – Влияние толщины слоя электрополимеризованного нейтрального красного на плотность тока при потенциале 200 мВ на ферментных электродах от количества циклов при электрополимеризации.

Как видно из характера зависимости, увеличение толщины слоя полимера за счет увеличения количества циклов от 5 до 25 приводит к сильному увеличению плотности тока окисления водорода на гидрогеназном электроде. Это, по-видимому, связано с увеличением степени модификации поверхности электрода, и увеличением количества фермента, правильно ориентированного на электроде. Последующее увеличение толщины слоя (более 25 циклов) приводит к увеличению сопротивления слоя полимера и данный процесс начинает лимитировать скорость ферментативной реакции.

Сравнили электрокаталитические характеристики электрода, функционирующего по принципу прямого биоэлектрокатализа и электрода, модифицированного электрополимеризованным нейтральным красным. На рисунке изображены поляризационные кривые окисления водорода на гидрогеназном электроде, модифицированном промежуточным слоем полимеризованного нейтрального красного, и ферментном электроде с неподготовленной поверхностью (рис. 20).

Как видно из рисунка, значение максимальной плотности тока окисления водорода для электрода, модифицированного нейтральным красным, превосходит аналогичное для электродов с неподготовленной поверхностью в 4-5 раз во всей области потенциалов.



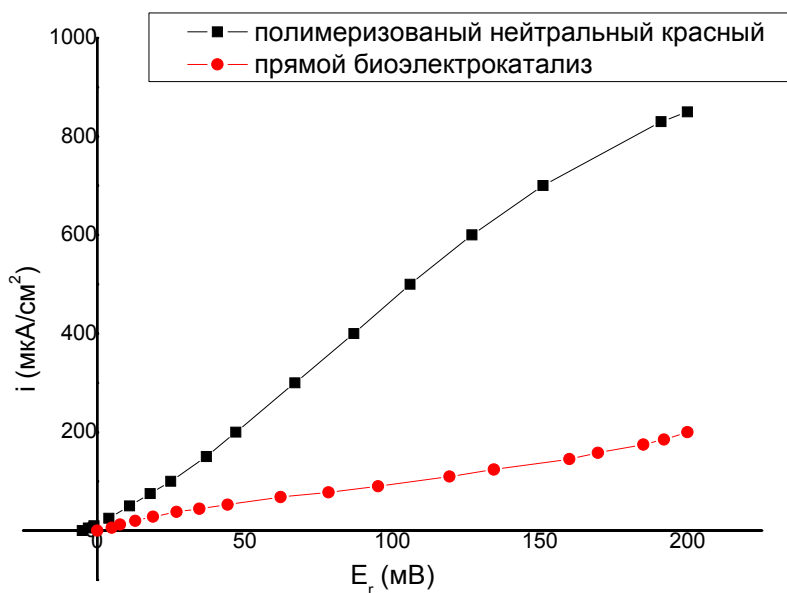


Рисунок 20 – Поляризационные кривые окисления водорода в атмосфере водорода на электроде, модифицированном слоем электрополимеризованного нейтрального красного, и электроде с непродобработанной поверхностью (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7, 25°C).

Таким образом, приготовление ферментных электродов с использованием для модификации поверхности полимеризованного субстрата, позволяет получать высокоактивные водородные ферментные электроды. Максимальный ток окисления водорода достигается при толщине слоя, соответствующем 25 циклам при электрополимеризации нейтрального красного, и составляет 850 мкА/см<sup>2</sup> при потенциале 200 мВ. Более того, применение полимеров на основе азиновых красителей предпочтительно ввиду нетоксичности, а также низкой стоимости и доступности многих соединений данного класса.

*Сравнение электрокаталитических свойств водородных гидрогеназных электродов, полученных разными методами.* Представляется интересным сравнить электрокаталитические характеристики самых активных электродов, полученных разными методами. На рис. 21 представлены поляризационные кривые окисления водорода на гидрогеназных электродах, полученных методами промежуточной модификацией поверхности проводящим полипирролом на основе N-метил-N'-(12-пиррол-1-илдодецил)-4,4'-бипиридина (ПВ), замещенного виологеном (ППВ),

сополимером анилина и N,N'-бис(5-анилинопентил)-4,4'-бипиридил (АВ), ферментного электрода с иммобилизованным полиэлектrolитным комплексом (ПЭК) (гидрогеназа из *T. roseopersicina* и ПВ) и гидрогеназного электрода с непредобработанной поверхностью.

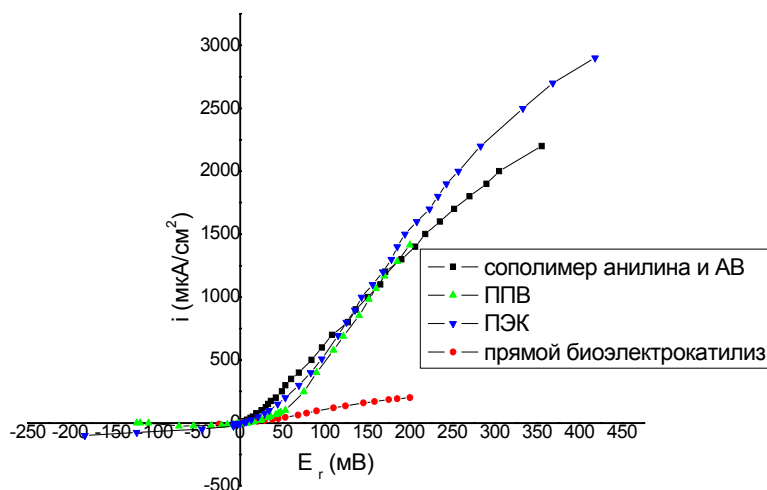


Рисунок 21 – Поляризационные кривые окисления водорода на электродах, полученных методами модификации поверхности проводящим полипирролом, замещенным виологеном (ППВ), сополимером анилина и АВ, электрода с иммобилизованным ПЭК и электрода с непредобработанной поверхностью (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7, 25°C).

Из представленного рисунка видно, что электрод, поверхность которого предварительно модифицирована ПВ, долгое время считавшийся лучшим по своим электрокаталитическим характеристикам, уступает по своей активности электродам, полученным методами, включающими стадии иммобилизации ПЭК и сополимеризации анилина и АВ. Причем при высоких значениях потенциала плотность тока на гидрогеназном электроде с иммобилизованным ПЭК почти на четверть выше, чем у электродов, предварительно модифицированных сополимером анилина и АВ. Однако при перенапряжениях до 120 мВ электроды на основе анилина и гидрогеназы из *T. roseopersicina* оказываются более активны, чем гидрогеназные электроды, модифицированные ПЭК (рис. 22). На данном рисунке приведены поляризационные кривые окисления водорода на ферментных

электродах, модифицированных ППВ, ПЭК, сополимером анилина и АВ и работающего по принципу прямого биоэлектрокатализа.

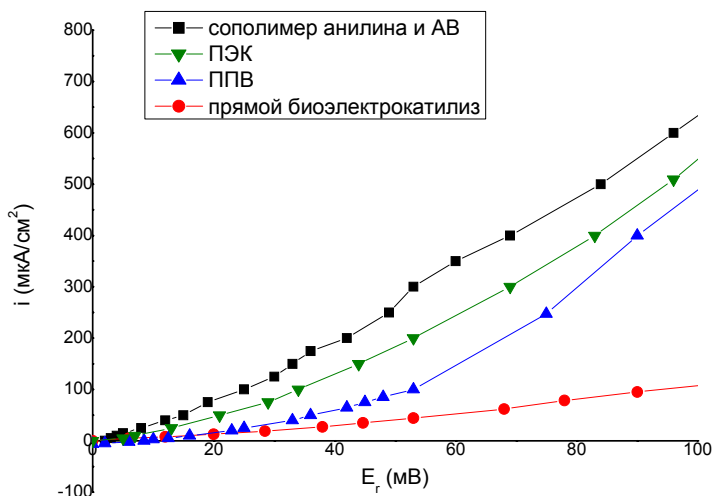


Рисунок 22 – Поляризационные кривые окисления водорода на электродах, полученных методами модификации поверхности проводящим полипирролом, замещенным виологеном (ППВ), сополимером анилина и АВ, электрода с иммобилизованным ПЭК и электрода с непродобработанной поверхностью (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , рН 7, 25°C).

В области низких потенциалов, как видно из рисунка, удалось значительно повысить эффективность биоэлектрокатализа гидрогеназами, так при перенапряжении в 50 мВ плотность тока окисления водорода на гидрогеназных электродах, модифицированных сополимером анилина и АВ и гидрогеназой из *T. roseopersicina*, почти в 4 раза превысила аналогичную для ферментного электрода, модифицированного ППВ. Что свидетельствует о приближении активностей ферментных электродов к диффузионно контролируруемому пределу.

Таким образом, удалось улучшить токовые характеристики водородных гидрогеназных электродов во всей области потенциалов, а области низких потенциалов улучшения составили до 4-х раз. Диапазон перенапряжений, в котором ферментные электроды остаются стабильными, был увеличен более чем в два раза.

*Разработка биосенсора для определения молекулярного водорода.*  
*Определение аналитических характеристик биосенсора.* В настоящее время активно развиваются методы получения биоводорода с использованием микроорганизмов. В связи с этим, возникает проблема определения его концентрации в культуральных средах. Существующие на данный момент сенсоры на водород на основе благородных металлов не подходят для выполнения этих задач, поскольку чувствительный элемент даёт отклик на другие соединения, выделяемые бактериями (например, метан), либо “отравляется” ими (сероводородом или окисью углерода).

На рис. 23 представлена зависимость тока окисления водорода при 200 мВ (отн. СВЭ, 1 атм. Н<sub>2</sub>) на ферментных электродах, модифицированных трехслойным полиэлектролитным комплексом (гидрогеназа из *T.roseopersicina* и олиго-параксилилен-N,N'-4,4'-дипиридил (ПВ)) от концентрации водорода в газовой смеси водород-аргон.

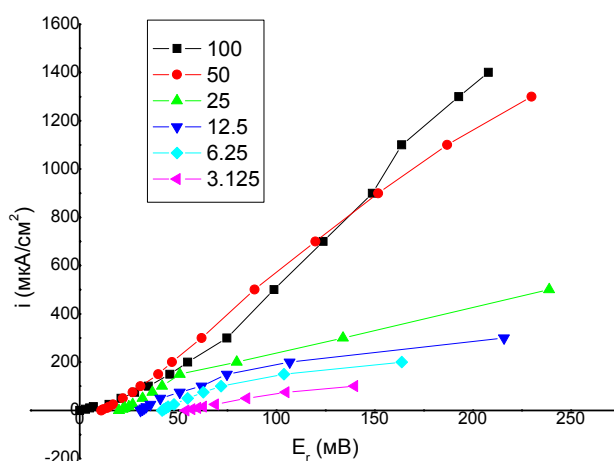


Рисунок 23 – Поляризационные кривые для ферментных электродов, модифицированных трехслойным полиэлектролитным комплексом (гидрогеназа из *T.roseopersicina* и ПВ) при разных концентрациях водорода в смеси с аргоном (0,05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,1 М КСl, рН 7, 25°С).

При высоких концентрациях водорода в смеси профиль поляризационной кривой описывается двумя экспонентами, что хорошо согласуется с теорией замедленного разряда. При понижении концентрации поляризационная кривая переходит в кривую, выпуклую вверх, что свидетельствует о смене лимитирующей

стадии реакции с электрохимически контролируемой на диффузионно контролируруемую.

Как видно из рисунка, токовые характеристики электрода сильно отличаются в зависимости от концентрации водорода. Зависимость плотности тока окисления водорода при 100 мВ от концентрации водорода в смеси представлена на рис. 24.

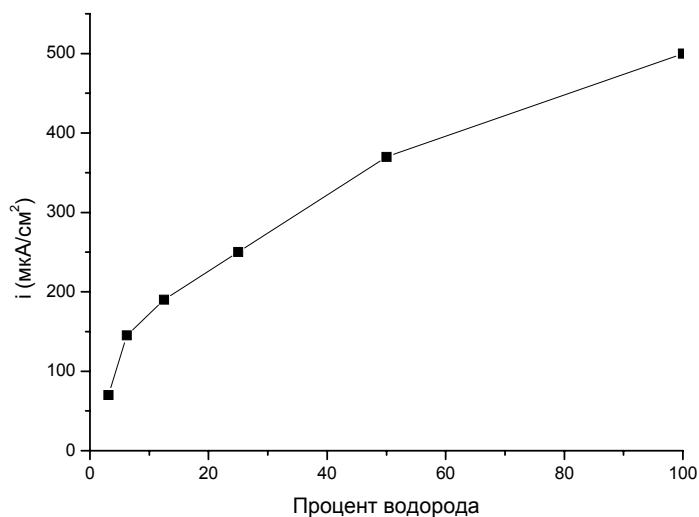


Рисунок 24 – Влияние изменения концентрации водорода в смеси с аргоном на значение плотности тока при потенциале 100 мВ от концентрации водорода для ферментного электродов. (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7, 25°C).

Данная кривая с насыщением может служить градуировкой для определения концентраций водорода в смесях неизвестного состава. Следовательно, водородный ферментный электрод на основе гидрогеназы из *T.roseopersicina* и ПВ может использоваться как биосенсор на водород в амперометрическом режиме.

Чувствительность амперометрического биосенсора на водород, вычисленная по начальному участку калибровочного графика, составила  $3 \text{ A M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ , предел обнаружения водорода составил  $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ .

Наблюдаемое значение потенциала разомкнутой цепи также зависит от концентрации водорода. Зависимости стационарного потенциала от концентрации водорода исследовали в потенциометрическом режиме (рис. 25).

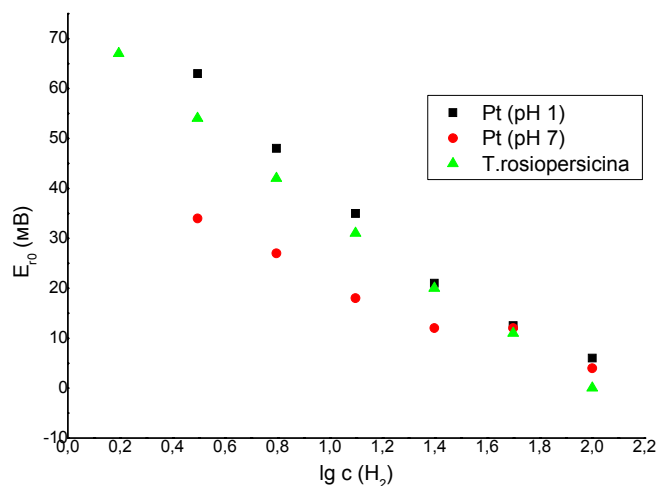


Рисунок 25 – Влияние изменения концентрации водорода в смеси с аргоном на значение потенциала разомкнутой цепи от концентрации водорода для ферментного и платиновых электродов. (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , 25°C).

На данном рисунке представлена зависимость потенциала разомкнутой цепи от концентрации водорода для ферментного электрода на основе гидрогеназы из *T.rosiopersicina* и платиновых электродов. Таким образом, чувствительность потенциометрического биосенсора на водород составляет 59 мВ на декаду, что соответствует теоретическому пределу.

При низких концентрациях водорода (менее 3%) равновесный потенциал на платине не устанавливался в течение 300 секунд, в то время как на ферментных электродах он устанавливался менее, чем за сто секунд.

Таким образом, показана применимость гидрогеназных топливных электродов, модифицированных трехслойным полиэлектrolитным комплексом на основе гидрогеназы из *T.roseopersicina* и олиго-параксилилен- $\text{N},\text{N}'$ -4,4'-дипиридил для определения концентрации водорода в потенциометрическом и амперометрическом режимах.

Таким образом, разработаны 2 лабораторных образца (в ТЗ – 2 лабораторных образца) биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе биоэлектрокатализа ферментами гидрогеназами, обеспечивающие определение водорода с чувствительностью  $3 \text{ A} \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$  (в ТЗ – не менее  $1 \text{ A} \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$ ) и пределом обнаружения  $3 \times 10^{-8} \text{ M}$  (в ТЗ – не более  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ).

## 2.4. Разработка научно-методических материалов к учебным курсам.

Разработаны новые программы учебных лекционных и практических курсов по обязательным (Метрологические основы химического анализа, Методы разделения и концентрирования, Хроматография и капиллярный электрофорез в аналитической химии, Спектроскопические методы анализа, Электрохимические методы анализа, Анализ важнейших объектов; Кинетические, биохимические и биологические методы анализа) для всех студентов дисциплинам и курсам по выбору (Масс-спектрометрия и хромато-масс-спектрометрия в химическом анализе; Проточный и непрерывный анализ; Химические и биохимические сенсоры; Аналитический контроль и его организация; Внелабораторный химический анализ). Аннотации программ перечисленных курсов прилагаются.

*Метрологические основы химического анализа (28 ауд.ч.).* Основные методы оценки погрешности и неопределенности результатов химического анализа. Методы проверки нормального закона распределения данных. Основы дисперсионного, корреляционного и регрессионного анализа (в одномерном и многомерном вариантах). Методы классификации химических данных и математического планирования химического эксперимента. В программе курса предусмотрено выполнение и разбор четырех домашних и двух аудиторных контрольных работ.

*Методы разделения и концентрирования (28 ауд.ч.).* Общая характеристика, понятия и термины, классификация методов разделения и концентрирования. Количественные характеристики разделения и концентрирования. Теоретические положения основных методов разделения и концентрирования: жидкость - жидкостной экстракции, жидкостной экстракции из твердых матриц, сверхкритической флюидной экстракции, сорбционных, дистилляционных и других методов. Достоинства и ограничения методов. Особенности сочетания концентрирования с методами последующего определения. Использование методов разделения и концентрирования в анализе объектов окружающей среды, пищевых и медико-биологических, промышленных объектов и минерального сырья.

*Хроматография и капиллярный электрофорез в аналитической химии (86 ауд.ч.).* Основные закономерности хроматографического разделения соединений. Основные теоретические положения газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии, их приборное оснащение и практическое использование. Основы и области применения хромато-масс-спектрологии. Варианты адсорбционной высокоэффективной жидкостной хроматографии: нормально-фазовая и обращено-фазовая. Механизмы разделения, подвижные фазы, роль и особенности силикагеля и модифицированных силикагелей как неподвижной фазы в ВЭЖХ, способы детектирования. Варианты хроматографического разделения ионизированных соединений: ионная и ион-парная хроматография. Основные представления о механизме ионного обмена. Электросепарационные методы: капиллярный зонный электрофорез, мицелярная электрокинетическая хроматография, капиллярная электрохроматография, изоэлектрофокусирование. Сопоставление ВЭЖХ и электросепарационных методов. Применение хроматографических методов в химическом анализе.

*Спектроскопические методы анализа (64 ауд.ч.).* Методы аналитической атомной спектроскопии: атомно-эмиссионная, атомно-абсорбционная, атомно-флуоресцентная спектроскопия. Физические основы; классификация методов; источники атомизации и возбуждения; качественный и количественный анализ. Спектральное оборудование. Метрологические характеристики методов. Рентгеновская спектроскопия. Классификации методов. Источники и детекторы излучения. Качественный и количественный анализ. Электронная спектроскопия и близкие к ней методы. Особенности анализа поверхности твердого тела. Источники и детекторы излучения. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия. Качественный и количественный анализ. Оже-электронная спектроскопия. Принципы и область использования.

Методы молекулярной спектроскопии: аналитическая абсорбционная молекулярная спектроскопия (спектрофотометрия) в УФ и видимой области спектра. Законы поглощения электромагнитного излучения. Анализ многокомпонентных систем. Производная абсорбционная молекулярная спектроскопия. Люминесцентный анализ. Теория молекулярной люминесценции. Флуоресценция и фосфоресценция. Люминесцентный анализ органических и



неорганических веществ. Инфракрасная спектрофотометрия, ее теоретические и методические основы. Условия технической реализации Фурье-спектрометрии, области применения. Спектроскопия комбинационного рассеяния. Теоретические основы, примеры использования. Лазерная спектроскопия. Методы лазерной атомно-ионизационной спектроскопии, резонансная и ступенчатая фотоионизация атомов и молекул. Метод лазерной термолинзовой спектрометрии. Теоретические основы и области применения методов.

Ядерно-физические методы. Классификации методов, аппаратура; применение. Гамма-резонансная (мессбауэровская) спектроскопия. Принципы, аппаратура, применение.

*Электрохимические методы анализа (64 ауд.ч.).* Электрохимическая термодинамика и кинетика. Электрохимический потенциал. Массоперенос в аналитической химии. Диффузионные законы Фика. Преимущества микроэлектродов. Электрохимическая гидродинамика. Виды проточных детекторов. Стационарные электроаналитические методы. Хроноамперометрия. Полярография. Нормальная и дифференциальная импульсная вольтамперометрия. Квадратноволновая вольтамперометрия. Кулонометрические методы анализа. Циклическая вольтамперометрия. Циклическая вольтамперометрия в случаях каталитической реакции и адсорбции. Инверсионная вольтамперометрия. Потенциометрия. Мембранные электроды: состав, компоненты мембран их функции. Поляризуемая граница несмешивающихся жидкостей. Области и примеры применения методов.

*Анализ важнейших объектов (28 ауд.ч.).* Основные объекты анализа. Пробоотбор. Пробоподготовка. Анализ вод; их классификация; отбор и хранение проб. Определение обобщенных физических и химических показателей, определяющих качество воды. Анализ воздуха, его химический состав. Способы и методы отбора проб воздуха. Определение неорганических и органических компонентов воздуха природного и техногенного происхождения. Анализ почв и донных отложений, их химический состав, отбор проб. Определение обобщенных показателей, неорганических и органических компонентов. Анализ пищевых и сельскохозяйственных продуктов. Анализ биологических материалов на содержание лекарственных препаратов, токсичных и одурманивающих веществ.

Тест-методы. Анализ геологических объектов. Анализ металлов и сплавов. Анализ веществ высокой чистоты.

*Кинетические, биохимические и биологические методы анализа (28 ауд.ч.).* Сущность кинетических, биохимических и биологических методов анализа, их особенности, преимущества и недостатки. Определение содержания веществ по данным кинетических измерений. Методы измерения скорости индикаторных реакций. Чувствительность и селективность методов, пути их повышения. Каталитический и некаталитический варианты *кинетических* методов. *Ферментативные* методы анализа. Сведения о структуре, свойствах ферментов, их классификации, механизме действия. Субстраты ферментов, активаторы и ингибиторы; их определение. Имобилизованные ферменты и их применение в химическом анализе. Ферментные электроды. Ферментативные тест-методы. Сущность иммунного анализа. Иммуноферментный анализ. Аналитический сигнал в *биологических* методах, способы его регистрации. Типы индикаторных организмов. Применение методов для определения неорганических и органических соединений в различных объектах.

*Масс-спектрометрия и хромато-масс-спектрометрия в химическом анализе (36 ауд.ч.).* Краткие теоретические основы метода масс-спектрометрии. Различные методы ионизации проб (термическая ионизация, искровая ионизация, ионизация в индуктивно-связанной плазме); способы ионизации органических молекул, ионизация при атмосферном давлении. Различные типы масс-спектрометров (квадрупольные, квадрупольные ловушки (сферические, линейные), орбитальные ловушки, секторные масс-анализаторы, время-пролетные МС и др.). Параметры и рабочие характеристики основных коммерческих масс-спектрометров. Примеры применения масс-спектрометрии в элементном и молекулярном анализе (анализ и идентификация сложных органических соединений, изотопный анализ, детектирование следовых содержаний элементов и пр.).

Хроматомасс-спектрометрия. Сочетание масс-спектрометрии с газовой (ГХ-МС) и жидкостной хроматографией (ЖХ-МС). Использование ГХ-МС и ЖХ-МС для решения практических задач.

*Проточный и непрерывный анализ (14 ауд.ч.).* Классификация проточных методов определения органических и неорганических веществ, их особенности и

преимущества. Современное состояние проточных методов, в том числе комбинированных и автоматизированных. Варианты концентрирования веществ в проточных методах, а также особенности сочетания различных методов концентрирования, в первую очередь экстракционных и сорбционных, с проточным детектированием – спектрофотометрическим, электрохимическим, атомно-спектроскопическим и масс-спектрометрическим. Инструментальные особенности комбинированных методов. Применение проточных методов для решения задач химического анализа.

*Химические и биохимические сенсоры (14 ауд.ч.).* Основные типы химических сенсоров. Принципы их действия. Биосенсоры. Классификация биосенсоров и история их развития. Способы «биоузнавания» и примеры биомолекул. Типы трансдюсеров. Ферментные электроды: три поколения биосенсоров. Потенциометрические биосенсоры и полевые транзисторы. Биосенсоры II поколения. Примеры медиаторных систем. Примеры коммерческого использования. Биосенсоры III поколения. Использование биосенсоров в анализе различных объектов.

*Аналитический контроль и его организация (18 ауд.ч.).* Цели, задачи, область деятельности аналитической лаборатории. Анализ продукции. Понятие сертификации продукции. Принципы нормирования показателей состава веществ и содержания вредных примесей. Нормирование требований к точности измерений. Установление обоснованных норм погрешности. Статус методик количественного химического анализа. Сферы распространения государственного метрологического контроля и надзора. Аккредитация аналитических лабораторий. Обеспечение компетентности аналитической лаборатории. Показатели качества методик анализа. Внутрилабораторный оперативный контроль процедуры анализа. Межлабораторные сравнительные испытания. Стандартные образцы в системе обеспечения качества работы лаборатории. Основные принципы метрологической аттестации методик количественного химического анализа. Координация работы аналитической лаборатории и автоматизация процессов контроля качества процедуры анализа.

*Внелабораторный химический анализ (14 ауд.ч.).* Общая характеристика и классификация тест-методов. Краткая история, тенденции развития, химические

основы тест-методов. Общая характеристика средств для тестирования. Тест-средства на основе пенополиуретанов. Области применения тест-систем. Примеры определения неорганических и органических соединений в различных объектах: объектах окружающей среды, биологических жидкостях, пищевых продуктах.

2.5. Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс.

В соответствии с программой совершенствования учебного процесса лаборатории кафедры по результатам научных исследований дополняют материал лекционных курсов примерами практического использования различных современных методов анализа, выбирают и внедряют новые экспериментальные задачи в работу практикумов по различным учебным дисциплинам.

Так, в практикуме по хроматографическим методам анализа внедрена задача поопределению фенолов в воздухе рабочей зоны и жилых помещений методом ОФ ВЭЖХ с амперометрическим детектированием.

В практикуме по кинетическим методам поставлена новая задача по определению ионов тяжелых металлов (ртути, свинца и кадмия) ферментативным методом в природных водах.

В практикуме по электрохимическим методам анализа внедрена задача по определению витаминов, в частности аскорбиновой кислоты в напитках (соках, фармпрепаратах) методом дифференциально-импульсной полярографии.

Кроме того, должны быть внедрены в образовательный процесс следующие результаты НИР:

	Форма внедрения	Тип внедрения	Место внедрения
	1	2	3
1.	Лекционный курс в рамках специализации «аналитическая химия»	Новый курс «Тест методы анализа смесей органических соединений», 6 ч	Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра аналитической химии
2.	Лекционный курс в рамках специализации	Новый курс «Биоэлектрокатализ,	Химический факультет МГУ

	«аналитическая химия»	электроаналитические системы, электроактивные полимеры», 10 ч	имени М.В. Ломоносова, кафедра аналитической химии
3.	Задача в спецпрактикуме в рамках специализации «аналитическая химия»	Новая задача «Определение фенолов в сточных и природных водах с предварительным сорбционным концентрированием с амперометрическим детектором», 4 ч	Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра аналитической химии
4.	Задача в спецпрактикуме в рамках специализации «аналитическая химия»	Новая задача «Проточное сорбционно-атомно-абсорбционное определение элементов и их форм в водах», 4 ч	Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра аналитической химии

2.6. Разработка методики определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии.

*Цель работы* состояла в разработке высокочувствительных подходов для сорбционно-жидкостно-хроматографического определения гидразинов.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

Изучение возможностей ионообменного концентрирования НДМГ, совместная оптимизация условий проточного on-line концентрирования и ионохроматографического определения, оценка перспектив применения предложенного подхода.

Выбор наиболее перспективных дериватизирующих реагентов для получения гидрофобных флуоресцирующих или интенсивно поглощающих производных гидразинов, подходящих для определения гидразинов методом реакционной жидкостной хроматографии.

Изучение условий предколоночной дериватизации НДМГ и сопутствующих гидразинов с коричневым, *n*-диметиламинокоричным (*n*-ДМАКА), *o*-фталевым

(ОФА) альдегидами, 2,3-нафталиндиальдегидом (НДА), дансил хлоридом и 4-хлор-7-нитробензофуразаном (БФЗ).

Выбор оптимальных условий разделения и детектирования для всех гидрофобных производных гидразинов с 8 дериватирующими реагентами, включая 4-хлор-5,7-динитробензофуразан (дБФЗ), в варианте обращено-фазовой ВЭЖХ.

Разработка стадии сорбционного концентрирования производных гидразинов, обеспечивающих наименьшие пределы обнаружения.

Разработка методик проточного сорбционно-жидкостно-хроматографического определения гидразина и несимметричного диметилгидразина в природных водах.

*Ионохроматографическое определение гидразинов с динамическим сорбционным on-line концентрированием.* Ионная хроматография с амперометрическим детектированием является прямым, простым и экспрессным методом определения гидразинов в водных растворах. Для ионной хроматографии с амперометрическим детектированием характерна высокая чувствительность: предел обнаружения НДМГ составляет 1 мкг/л.

Наиболее привлекательным способом повышения чувствительности в жидкостной хроматографии является применение проточного сорбционного концентрирования в on-line режиме, что обеспечивает существенно более высокие коэффициенты концентрирования по сравнению с другими вариантами концентрирования. Для разработки сорбционно-хроматографического подхода реализована схема с установкой концентрирующей колонки на место петли шестиходового крана-дозатора (рис. 26).

Количественное и селективное извлечение определяемых микрокомпонентов из анализируемых растворов на стадии концентрирования обеспечивается правильным выбором сорбента и специальной подготовкой пробы перед анализом. В работе использовали в качестве концентрирующих сорбентов сульфокатионообменники Nucleosil 10SA, Диапак Сульфо и Диасорб Сульфо. Использование хроматографического сорбента для концентрирования дает ряд преимуществ по сравнению с другими, поскольку в этом случае равновесие в фазе сорбента устанавливается быстро, и реализуется количественная сорбция и десорбция компонентов пробы.

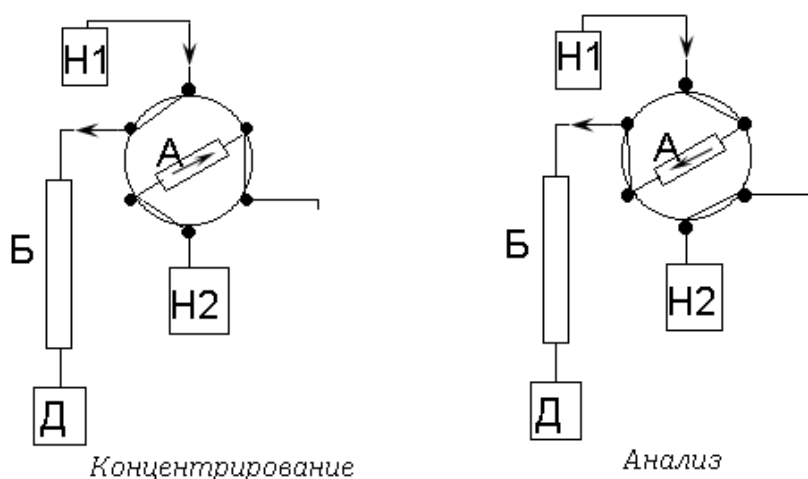


Рисунок 26 – Схема хроматографической установки с on-line концентрированием пробы. Н1, Н2- насосы высокого давления, Д - амперометрический детектор, А - колонка для концентрирования, Б - разделяющая колонка.

Для успешной реализации сорбции НДМГ по механизму ионного обмена необходим выбор соответствующего рН раствора пробы для перевода его в протонированную форму и предупреждения окисления в процессе сорбции. При этом необходимо учитывать, что высокая концентрация сильной кислоты приводит к насыщению ионообменной колонки ионами водорода, что препятствует удерживанию ионов гидразинов. В качестве фоновых использовали растворы серной, аскорбиновой, лимонной и уксусной кислот, концентрации варьировали от 1 до 10 мМ. Установлено, что количественная сорбция и десорбция гидразинов реализуется на фоне 10 мМ уксусной кислоты, обеспечивающей рН пробы 3.25. Оптимальными условиями, позволяющими сочетать стадию десорбции с последующим хроматографическим определением, установлены 100 мМ ацетат аммония (рН 5,4) со скоростью подачи 1 мл/мин.

Сорбционно-ионохроматографическое определение гидразинов с предварительным on-line концентрированием 10 мл пробы на колонке с катионообменником Nucleosil 10 SA (4x50 мм) характеризуются пределами обнаружения в водной фазе – 0.003, 0.06 и 0.1 мкг/л для гидразина, метилгидразина и 1,1-диметилгидразина, соответственно. Разработанный подход позволяет

осуществлять определение НДМГ на уровне ПДК для вод рыбо-хозяйственного назначения, составляющем 0,5 мкг/л.

Успешное определение ультрамалых концентраций 1,1-диметилгидразина на уровне  $10^{-9}$ % реализуется при on-line концентрировании 100 мл пробы на колонке с сорбентом Nucleosil 10SA (4x50 мм). Предел обнаружения при соотношении сигнал: шум равном 3:1 составил 0,02 мкг/л, что позволяет контролировать содержание НДМГ на ОДУ для вод хозяйственно-бытового назначения.

Разработанные подходы достаточно экспрессны, удобны и просты в исполнении. Однако их ограничением является конкурентная сорбция катионов металлов, препятствующих ионообменному концентрированию НДМГ при их концентрации более 1 мМ. В результате подход, основанный на использовании ионообменного концентрирования, оказался неуниверсальным, имеющим ограниченную область применения для вод с слабой минерализацией. Мешающее влияние катионов на стадии сорбции можно устранить, поменяв природу целевого компонента, т.е. определять его в виде гидрофобных производных органических реагентов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

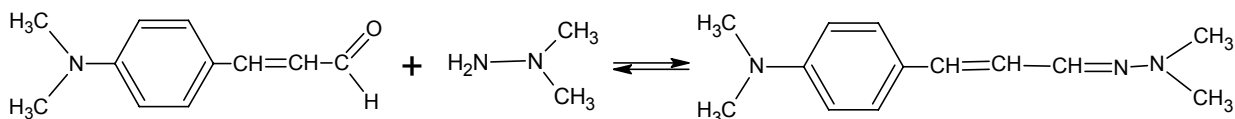
*Дериватизация и хроматографическое определение НДМГ с альдегидами.* Взаимодействие несимметричного диметилгидразина с альдегидами протекает достаточно экспрессно – в течение 7-15 мин при нагревании (75-100°C) (табл. 1). Для поиска наиболее чувствительных реагентов для разработки сорбционно-хроматографической методики изучали дериватизацию НДМГ различными реагентами и исследовали поведение полученных производных в хроматографической системе. Интерес представляли как поглощающие УФ-излучение, так и флуоресцирующие производные. Перечень исследуемых реагентов и условия получения их производных с НДМГ, установленные в работе, приведены в табл. 7.

Чтобы обеспечить возможность чувствительного флуориметрического детектирования НДМГ, для получения гидрофобных производных использовали коричный и *n*-диметиламинокоричный альдегиды. Последний реагент выбрали из-за лучшей растворимости в водных растворах. Установлено, что для полного растворения требуемого для реакции с НДМГ большого избытка *n*-ДМАКА



достаточно 30 % органического растворителя (ДМФА), в то время как для коричневого альдегида необходимо 50% ацетонитрила.

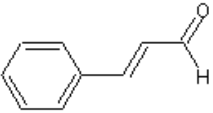
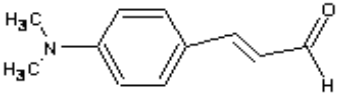
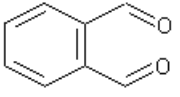
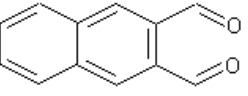
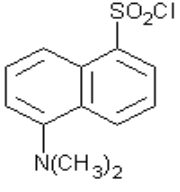
Взаимодействие НДМГ с *n*-ДМАКА происходит по следующей схеме:

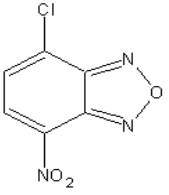
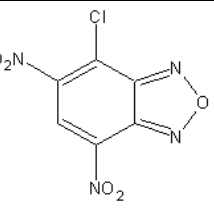


Одним из основных факторов, влияющих на выход продукта реакции конденсации гидразинов с карбонильными соединениями, является рН реакционной смеси. Известно, что график «рН скорость образования» имеет максимум, определяемый двумя противоположными эффектами: общим кислотным катализом реакции присоединения и уменьшением концентрации свободного азотистого основания при превращении его в сопряженную кислоту. При этом максимум наблюдается при рН, близких к рКа соответствующего гидразина. Приведенные на рис. 27 зависимости показали, что максимальный выход диметилгидразонов достигается при рН 5.4 и 5.9-7.0 для коричневого альдегида и *n*-ДМАКА соответственно, что согласуется с теоретическими представлениями о механизме реакций. Образующиеся гидразоны можно регистрировать с помощью спектрофотометрического или флуориметрического детекторов (табл. 7).

Варьирование природы буферного раствора на примере использования аммонийно-ацетатного, фосфатного и цитратного буферных растворов не показало выраженной зависимости площади пика диметилгидразонов при флуориметрическом детектировании от природы используемого буферного раствора, поэтому выбран аммонийно-ацетатный буферный раствор для реакции образования диметилгидразона коричневого альдегида и фосфатный – для гидразона *n*-ДМАКА как обладающие максимальной буферной емкостью при необходимых рН для проведения дериватизации. Установлено, что изменение концентрации аммонийно-ацетатного буферного раствора в диапазоне 0.01–0.1 М не влияет на площадь пика диметилгидразона коричневого альдегида. Для *n*-ДМАКА наблюдается максимум при 0.05 М, при дальнейшем увеличении концентрации, по-видимому, уменьшается сольватирующая способность молекул растворителя.

Таблица 7 – Условия образования производных НДМГ с изученными дериватизирующими реагентами.

Реагент	Структурная формула	Условия детектирования производных		Условия дериватизации			
		Детектор	Параметры детектирования	Время реакции	Температура	pH	Состав реакционного раствора
Коричный альдегид		ФЛД, СФД	$\lambda_{\text{возб}} = 328 \text{ нм},$ $\lambda_{\text{эм}} = 396 \text{ нм};$ $\lambda_{\text{погл}} = 300 \text{ нм}$	15 мин	100°C	5.4	0.05М аммонийно-ацетатный, 50% ацетонитрила
<i>n</i> -Диметиламино-коричный альдегид		ФЛД, СФД	$\lambda_{\text{возб}} = 465 \text{ нм},$ $\lambda_{\text{эм}} = 535 \text{ нм};$ $\lambda_{\text{погл}} = 460 \text{ нм}$	7 мин	100°C	7.0	0.05М фосфатный, 30% ДМФА
<i>o</i> -Фталевый альдегид		СФД	340 нм	10 мин	20°C	9.5	0.1М боратный
2,3-Нафталин-диальдегид		СФД	290 нм	10 мин	20°C	9.0	0.1М боратный
Дансил хлорид		ФЛД, СФД	$\lambda_{\text{возб.}} = 360 \text{ нм},$ $\lambda_{\text{эм.}} = 500 \text{ нм};$ $\lambda_{\text{погл}} = 360 \text{ нм}$	1 час	60°C	9.5	0.1М боратный

4-хлор-7-нитро-бензофуразан		ФЛД, СФД	$\lambda_{\text{возб}}=488 \text{ нм}$ $\lambda_{\text{рег}}=540 \text{ нм};$ $\lambda_{\text{погл}}=488 \text{ нм}$	2 часа	100°C	7.0	0.06М фосфатный
4-хлор-5,7-динитро-бензофуразан		СФД	550 нм	15 мин	20°C	7.0	0.06М фосфатный

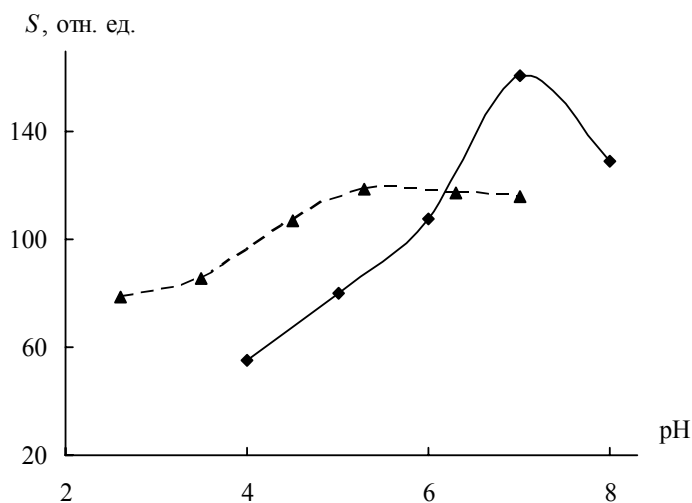


Рисунок 27 – Зависимость выхода продукта реакции – диметилгидразона (▲) коричневого альдегида и (◆) *n*-ДМАКА от pH реакционной смеси.

При подкислении реакционной смеси наблюдается протонирование гидразонов, что подтверждается при варьировании pH подвижной фазы для ВЭЖХ-разделения увеличением времени удерживания с увеличением pH подвижной фазы и снижением эффективности за счет сильного взаимодействия непротонированной гидрофобной формы гидразона с поверхностью сорбента. Образование протонированной формы сопровождается увеличением аналитического сигнала для обоих гидразонов и смещением максимумов поглощения и возбуждения флуоресценции гидразона коричневого альдегида в коротковолновую область.

Установленные оптимальные условия хроматографического определения гидразонов и пределы обнаружения при объеме пробы 100 мкл приведены в табл. 8.

Правильность разработанных подходов к определению НДМГ провели методом «введено-найдено». Хроматограмма образца природной воды с добавкой НДМГ представлены на рис. 28. Флуориметрическое детектирование производных НДМГ для обоих альдегидов оказалось менее чувствительным, чем спектрофотометрическое, что связано с наличием большого количества интенсивно флуоресцирующих побочных продуктов реакции. Выбранные условия, хроматографические параметры и метрологические характеристики позволяют проводить определение НДМГ в природной воде на уровне десятков мкг/л, т.е. не

достаточно чувствительно, поэтому разработка последующей стадии сорбции для этих производных нецелесообразна.

Таблица 8 – Условия хроматографического определения диметилгидразонов и достигнутые пределы обнаружения.

Реагент	Детектор	Состав элюента	$F$ , мл/мин	$k'$	$R_s$	$C_{min}$ , мг/л
КА	СФД	60% 0.05M $H_3PO_4$ (pH 2.3)/ 40% $CH_3CN$	1.0	2.7	1.5	0.02
	ФЛД	55% 0.05M $CH_3COOH$ (pH 3.4)/ 45% $CH_3CN$	1.0	7.6	1.6	0.4
<i>n</i> -ДМАКА	СФД	80% 0.05M $H_3PO_4$ (pH 2.3)/ 20% $CH_3CN$	0.7	3.4	1.3	0.004
	ФЛД	80% 0.05M $H_3PO_4$ (pH 2.3)/ 20% $CH_3CN$	1.0	3.5	1.5	0.006

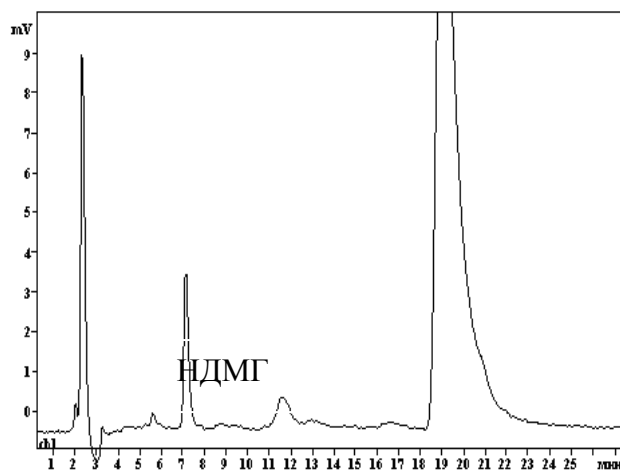


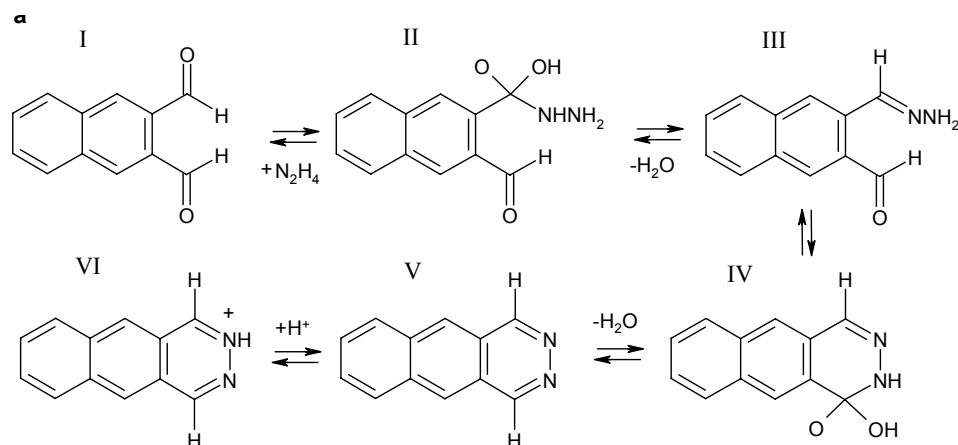
Рисунок 28 – Хроматограмма образца воды с добавкой 0.05 мг/л НДМГ.

Реагент – *n*-ДМАКА. Колонка Nucleosil 5-C18, 4.6 × 150 мм. Элюент: 80% 0.05M  $H_3PO_4$ /20%  $CH_3CN$ . ФЛД,  $\lambda_{возб}$  = 465 нм,  $\lambda_{эм}$  = 535 нм.

*Применение диальдегидов для хроматографического определения гидразинов.*

Важным достоинством диальдегидов является их селективность к гидразинам, поскольку механизм этой реакции не требует введения дополнительного нуклеофильного реагента, как в случае реакций диальдегидов с аминами и

аминокислотами. Взаимодействие с гидразином завершается замыканием дополнительного шестичленного цикла согласно схеме:



Влияние pH на реакцию с диальдегидами обусловлено балансом двух факторов: протонированием гидразина, что вызывает уменьшение концентрации нейтральной формы, вступающей в реакцию, и кислотным катализом. При значении  $pH < 5$  более 99% гидразина в растворе находится в протонированной форме  $N_2H_5^+$ , а протонирование азота кардинально меняет скорость реакции. Для гидразинов  $pK_a = 7.2-7.9$ , следовательно, скорость образования нейтрального комплекса 2,3-диазоантрацена или нафтоцена будет значительно больше при  $pH > 8$ . Оптимальное значение pH выбирается таким, чтобы обеспечить концентрацию протонов, достаточную для катализа реакции конденсации, но малую для протонирования основной части гидразина.

Дериватизация первичной аминогруппы аминокислот, пептидов и аминов ортофталевым альдегидом хорошо известна и описана в научной литературе, в то время как возможность применения этого реагента для определения замещенных гидразинов практически не изучена. Реакции ОФА с аминогруппой протекают при комнатной температуре в течение нескольких минут, однако известно, что образующиеся производные не очень стабильны.

Установлено, что взаимодействие гидразин, ММГ и НДМГ с ОФА протекает при  $pH 9.5$ , где интенсивность флуоресценции производных гидразинов максимальна. Малая интенсивность флуоресценции ОФА-НДМГ является следствием неполного замыкания шестичленного цикла при образовании производного. Однако в хроматографической системе продукты детектируются лишь спектрофотометрическим детектором, что, вероятно, связано с нестабильностью флуоресцирующих форм в условиях хроматографического

разделения. Этот факт известен для ОФА-производных аминокислот. Предел обнаружения НДМГ составил 50 мкг/л.

Для более чувствительного определения гидразинов использовали НДА. Установили, что реакция с гидразином завершается за 2 мин, с ММГ – за 6 мин, с НДМГ – за 10 мин при комнатной температуре в щелочной среде (рН 9.0). Образующиеся диазоантрацены достаточно стабильны. НДА производные гидразина и ММГ регистрируются флуориметрическим детектором при  $\lambda = 395$  нм,  $\lambda_{эм.} = 500$  нм, в хроматографической системе максимум возбуждения флуоресценции наблюдали при 273 нм, вероятно, из-за влияния растворителей - компонентов подвижной фазы.

Ключевым параметром для хроматографического определения и детектирования НДА-гидразинов является рН подвижной фазы. Поведение диазоантраценов в хроматографической системе изучали в диапазоне рН 2.5 – 9.0, и наблюдали существенные различия в свойствах производных. Установили, что оптимальным рН для флуориметрического детектирования НДА-производного гидразина в хроматографической системе является 2.5-3.0, при котором образуется интенсивно флуоресцирующий кислотный конъюгат 2,3-диазоантрацена (V), т.е. структура VI на приведенной выше схеме. При элюировании подвижными фазами с нейтральной или щелочной средой сигнал флуоресценции Ги-НДА не регистрировался вследствие образования нефлуоресцирующего 2,3-диазоантрацена (V).

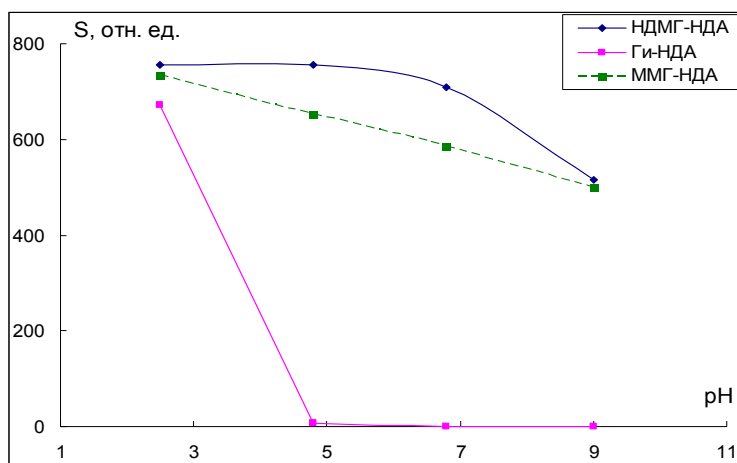


Рисунок 29 – Зависимость площади пика НДА-производных гидразинов от рН подвижной фазы.

Детектирование НДМГ-НДА возможно проводить только спектрофотометрически ( $\lambda_{\text{погл}} = 290 \text{ нм}$ ), вероятно, из-за образования гидразона с незамкнутым циклом из-за наличия двух заместителей в молекуле НДМГ. Его производное можно детектировать при любом значении pH в изученном диапазоне (рис. 29), однако при pH, близких к 9.0, интенсивность сигнала уменьшается, вероятно, в связи с гидролизом гидразона в щелочной среде. Чувствительность определения НДМГ с НДА значительно ниже, чем для производных гидразина и ММГ.

Таким образом, для наиболее чувствительного и одновременного определения гидразинов необходимо использовать подвижные фазы кислотного состава с pH 2.5 – 3.0.

Пределы обнаружения гидразинов, рассчитанные для соотношения сигнал:шум, равном 3:1, составили 50 мкг/л для гидразина и ММГ и 1 мкг/л для НДМГ. Хроматограмма смеси гидразинов представлена на рис. 30.

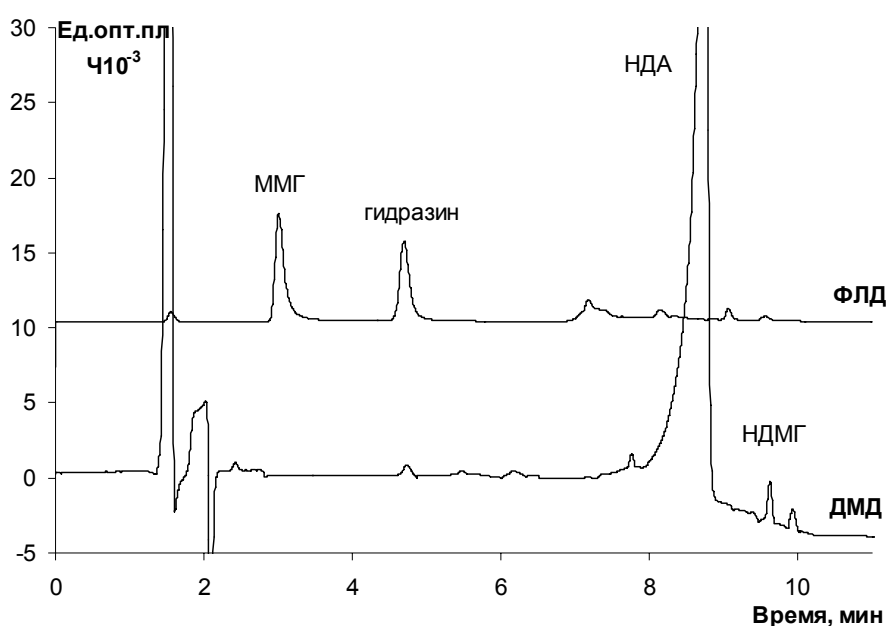


Рисунок 30 – Хроматограмма смеси гидразина (0.5 мкг/л), ММГ (0.5 мкг/л) и НДМГ (10 мкг/л) после дериватизации с НДА. Колонка Zorbax Eclipse AAA. Флуориметрическое (ФЛД) и диодно-матричное/ спектрофото-метрическое (ДМД) детектирование.

Для дополнительного повышения чувствительности разработали стадию сорбционного концентрирования НДА-гидразинов. Установлено, что для



обеспечения полноты сорбции производных гидразинов необходимо переводить продукты реакции в форму, удобную для хроматографического определения, то есть необходимо подкислять раствор пробы после дериватизации до pH 3.0, и в этих условиях проводить концентрирование на картриджах.

Среди изученных сорбентов наиболее эффективным для концентрирования производных гидразинов, обеспечивающим их количественную сорбцию и десорбцию, оказался Strata SDB-L, сочетающий механизмы неполярного удерживания с  $\pi$ - $\pi$  и гидрофобными взаимодействиями, и полностью исключая вторичные силанольные взаимодействия, позволяющий также осуществить эффективное удаление большинства посторонних компонентов и примесей.

Сочетание сорбционного концентрирования с ВЭЖХ разделением позволило добиться высокой чувствительности определения замещенных гидразинов: пределы обнаружения составили 2 нг/л для гидразина и ММГ и 50 нг/л для НДМГ при степени концентрирования 50.

Таким образом, показано, что 2,3-нафталиндиальдегид является эффективным и модификатором для экспрессного и высокочувствительного хроматографического определения гидразинов. Он реагирует с гидразинами при комнатной температуре быстро и селективно, поэтому обладает преимуществами по сравнению с другими дериватирующими реагентами.

*Дансил хлорид и хлорнитрозамещенные бензофуразаны как модификаторы для определения гидразинов методом ВЭЖХ.* Дериватизация аминсоединений с дансил хлоридом протекает при высоких pH (около 9), и главным требованием для протекания реакции является существование аминсоединения в нейтральной форме. Для реакции с гидразинами фоновый раствор должен иметь pH в интервале 7 – 9.5, так как при дальнейшем повышении щёлочности среды растёт вероятность протекания конкурирующей образованию производных реакции – гидролиза органического реагента. В ходе работы были зарегистрированы флуоресцирующие продукты для гидразина, ММГ и НДМГ и установлено, что оптимальными условиями детектирования производных являются длины волн  $\lambda_{\text{возб.}} = 360$  нм,  $\lambda_{\text{эм.}} = 500$  нм. Установлено, что максимальный выход продукта обеспечивается при нагревании при 60 °С в течение 1 часа в щелочной среде (pH 9.5).

Предел обнаружения НДМГ с дансил хлоридом составил только 0.05 мг/л. К тому же, этот подход требует длительной пробоподготовки, поэтому дансил хлорид не является перспективным для дальнейшей работы.

Далее исследовали реагенты на основе бензофуразанового скелета: 4-хлор-7-нитробензофуразан (БФЗ) и 4-хлор-5,7-динитробензофуразан (дБФЗ). 4-Хлор-7-нитробензофуразан является флуорогеном и не обладает собственной флуоресценцией, поэтому было изучено его применение для чувствительного ВЭЖХ определения гидразинов.

Нами установлено, что максимальный выход продукта БФЗ с НДМГ обеспечивается нагреванием при 100°C в течение 2 часов в нейтральной среде (рН 7.0), что согласуется с теоретическими представлениями. Полученный продукт реакции устойчив в растворе при комнатной температуре в течение 48 часов. В этих реакционных условиях для монометилгидразина получено его бис-производное с 4-хлор-7-нитробензофуразаном, имеющее максимум поглощения при 553 нм, не обладающее флуоресценцией. Структуры впервые полученных производных НДМГ и ММГ и достоверность идентификации подтверждены методом ВЭЖХ-МС с химической ионизацией в режиме сканирования отрицательных ионов. Соответствующая хроматограмма НДМГ-БФЗ приведена на рис. 31.

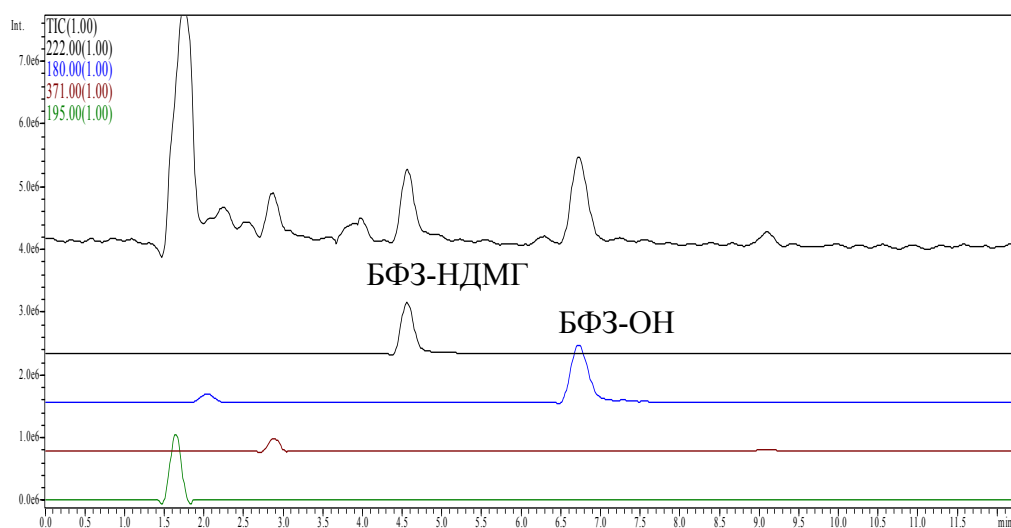


Рисунок 31 – Хроматограмма НДМГ-БФЗ ( $C_{\text{НДМГ}} = 50$  мг/л). Колонка Zorbax SB-C18, 4.6 × 150 мм. Элюент: 50% 0.1М ацетата аммония, 50% ацетонитрила.

Скорость потока 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрический детектор.

Изучение влияния рН элюента на площадь пика НДМГ-БФЗ показало, что в исследуемом диапазоне не наблюдается выраженной зависимости интенсивности сигнала от рН подвижной фазы. Однако рН элюента оказывает влияние на удерживание пиков сопутствующих компонентов, и наилучшее разделение от примесей достигается при рН 3.6, при котором также регистрируется наименьшее количество побочных продуктов реакции. Поскольку интенсивность флуоресценции зависит от содержания органического растворителя в подвижной фазе, в работе также изучили влияние этого фактора, варьируя количество растворителя в допустимых пределах, обеспечивающих разделение компонентов реакционной смеси. Показана необходимость 45-50% содержания растворителя в элюенте.

В результате исследования буферных растворов различной природы и концентрации в качестве оптимальной подвижной фазы выбрали 0.02М фосфатный буферный раствор (рН 3.6) с 50% ацетонитрила как обеспечивающий разделение БФЗ-производных НДМГ и ММГ, лучшее разрешение с пиками сопутствующих компонентов реакционной смеси и приемлемое время удерживания НДМГ-БФЗ. Хроматограмма производного НДМГ приведена на рис. 32.

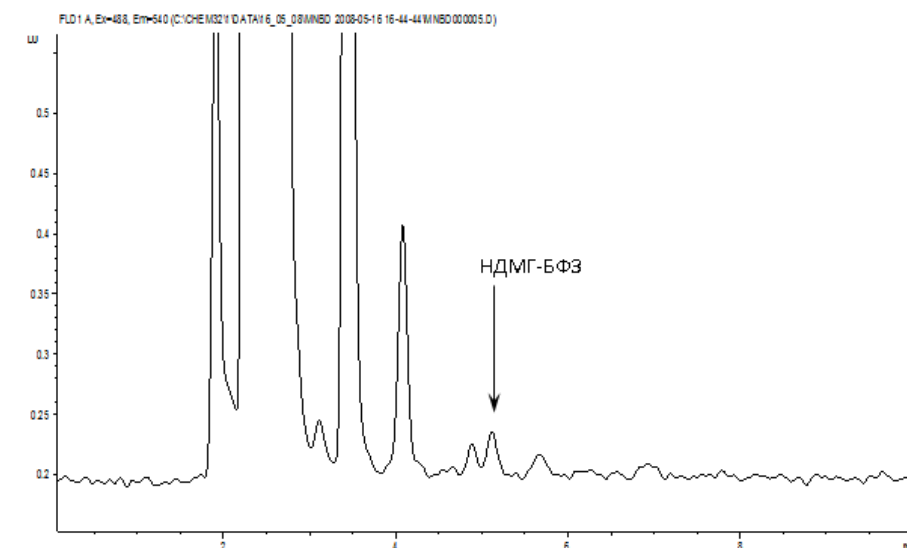


Рисунок 32 – Хроматограмма производного НДМГ-БФЗ ( $C_{\text{НДМГ}} = 5$  мкг/л). Колонка Zorbax SB-C18, 4.6×150 мм. Элюент: 50% 0.02 М фосфатный буферный раствор (рН 3.6), 50% ацетонитрила. Скорость потока 0.7 мл/мин. Детектор флуориметрический ( $\lambda_{\text{возб}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{эм}} = 540$  нм).

Предел обнаружения НДМГ с использованием метода ОФ ВЭЖХ с наиболее чувствительным флуориметрическим детектированием ( $\lambda_{\text{возб}} = 488 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{эм}} = 540 \text{ нм}$ ) составил 3 мкг/л при объеме вводимой пробы 100 мкл.

Последовавшая далее попытка сочетать сорбцию на картриджах Strata C18-E со стадией хроматографического разделения не позволила проводить определение малых количеств НДМГ из-за сложного состава матрицы реакционной смеси даже для модельных растворов. Длительная высокотемпературная реакция с БФЗ приводит к образованию многочисленных флуоресцирующих продуктов с аминсоединениями, которые при работе на низком уровне концентраций также сорбируются и затрудняют определение следовых количеств НДМГ в off-line или on-line режиме. Присутствие в реакционной смеси диметиламина, возможного продукта разложения НДМГ, затрудняет определение НДМГ, так как имеет схожие параметры детектирования и удерживания.

Введение еще одной нитрогруппы в молекулу бензофуразана изменяет его свойства и реакционную способность. Взаимодействие НДМГ и дБФЗ завершается за 15 мин при комнатной температуре, продукт интенсивно поглощает при 550 нм и не флуоресцирует.

Определение 1,1-диметилгидразина в виде производного 4-хлор-5,7-динитробензофуразана, описанное в работах М.И. Евгеньева и соавт., может быть перспективно при сочетании с сорбционным концентрированием. Реакция с дБФЗ проста и экспрессна, и значит, может быть легко автоматизирована. Оптимальными условиями реакции НДМГ с дБФЗ, обеспечивающими степень завершения реакции  $95 \pm 3\%$ , являются 0.06М фосфатный буферный раствор с pH 7.05. Полученный нами спектр поглощения НДМГ-дБФЗ в кювете с длиной оптического пути 1 см имеет максимум при 534-554 нм, положение которого сохраняется в хроматографической системе (550 нм).

Установлено, что разделение компонентов смеси достигается на колонке Zorbax SB-C18 (4,6×150мм) с помощью изократического элюирования 0,02М фосфатным буферным раствором (pH 4.0) с 50% содержанием ацетонитрила. Основные хроматографические параметры определения НДМГ приведены в таблице 9. Предел обнаружения НДМГ составил 2 мкг/л при объеме вводимой

пробы 250 мкл. Диапазон линейности и рассчитанные метрологические характеристики определения представлены в таблице 10.

Таким образом, реагент дБФЗ продемонстрировал высокую чувствительность ВЭЖХ-определения диметилгидразина, и в сочетании со стадией сорбционного концентрирования он может быть перспективным для определения следовых количеств НДМГ.

Для определения ультрамалых концентраций НДМГ изучили возможность сорбции производного дБФЗ в режиме off-line на картриджах для твердофазной экстракции Strata SDB-L и Strata C18-E. Установлено, что 100 мл раствора деривата с концентрацией 1 мкг/л НДМГ количественно сорбируется на указанных фазах. Количественное извлечение производного из картриджа достигается при элюировании 5 мл ацетонитрила с дальнейшей отгонкой растворителя и перерастворением остатка в 1 мл подвижной фазы. В элюате с Strata C18-E обнаружено  $98 \pm 7\%$  НДМГ-дБФЗ, с Strata SDB-L -  $94 \pm 10\%$  НДМГ-дБФЗ при  $C_{\text{НДМГ}} = 0.1$  мг/л.

Дополнительным преимуществом стадии сорбции является возможность легкого удаления избыточного количества непрореагировавшего дБФЗ простой промывкой картриджа дистиллированной водой в объеме 20 мл, что подтверждается отсутствием пика реагента на хроматограмме элюата. При работе с полимерной фазой Strata SDB-L возможно установить наибольшую скорость подачи пробы, сократив время пробоподготовки, поэтому для сорбционного концентрирования производного НДМГ выбрали картриджи с полимерным сорбентом Strata SDB-L.

Важно отметить, что хранение производного НДМГ-дБФЗ с концентрацией НДМГ 1 мг/л в условиях реакционной среды (рН 7) возможно в течение 48 ч при  $4^\circ\text{C}$ , в то время как низкие концентрации свежеприготовленного БФЗ-производного, например, 1 мкг/л, устойчивы в реакционном растворе в течение 2-3 часов при комнатной температуре. Поэтому при работе со следовыми количествами НДМГ рекомендуется проводить концентрирование пробы практически сразу после дериватизации.

Таблица 9 – Основные хроматографические параметры удерживания НДМГ-дБФЗ. Разделяющая колонка Zorbax SB-C18.

Способ определения	$t_R$ , мин	$t_R'$ , мин	$k'$	N, тт	Rs
ВЭЖХ-определение	4.8	3.3	2.2	4100	6.7
Сорбция off-line	4.8	3.7	3.4	3400	1.7
Сорбция on-line	10.2	8.6	5.4	3300	1.7

Таблица 10 – Метрологические характеристики определения НДМГ в виде производного с 4-хлор-5,7-динитробензофуразаном. Разделяющая колонка Zorbax SB-C18.

Способ определения	Диапазон линейности, мкг/л	$S_r$	$C_{min}$ , мкг/л	r	a	b
ВЭЖХ-определение	5 – 10000	0,05	2	0.9999	216	12
Сорбция off-line	0,05 – 5	0,08	0,02	0.9998	41	2
Сорбция on-line	0,005 – 1	0,06	0,002	0.9999	536	4

Диапазон линейности градуировочной зависимости определения НДМГ с сорбционным off-line концентрированием на Strata SDB-L составил 0,05 – 5 мкг/л, предел обнаружения – 20 нг/л при обработке 100 мл пробы (табл. 10). Хроматограмма off-line сорбционно-хроматографического определения НДМГ представлена на рис. 33.

Такой подход позволяет определять НДМГ на уровне, установленном санитарно-гигиеническими нормативами (60 нг/л). Однако трудоемкая и длительная пробоподготовка, влекущая также потери определяемого компонента на некоторых стадиях, создает сложности при рутинном анализе и в целом снижает производительность. Поэтому нами предложен и разработан автоматизированный способ высокочувствительного определения НДМГ с динамическим сорбционным on-line концентрированием.

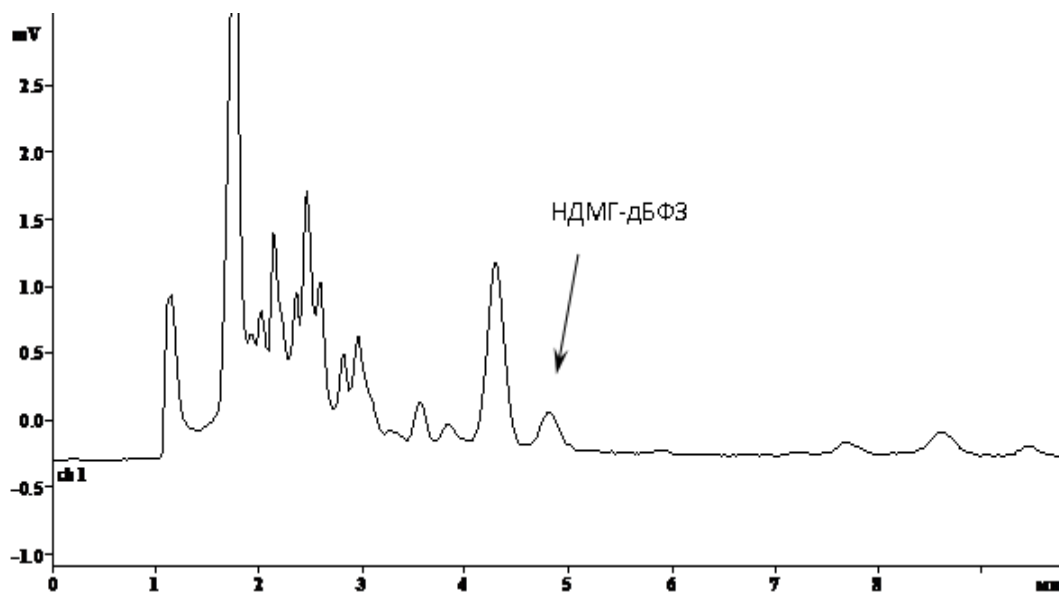


Рисунок 33 – Off-line сорбционно-хроматографическое определение НДМГ.  $C_{\text{НДМГ}}=50$  нг/л. Концентрирующий картридж Strata SDB-L. Разделяющая колонка Zorbax SB-C18 (4,6×150мм). Подвижная фаза: 0,02М фосфатный буферный раствор (рН 4,0), 50% ацетонитрила. Спектрофотометрический детектор,  $\lambda_{\text{погл.}}=550$  нм.

Для концентрирования использовали колонку размерами 4x50 мм, заполненную сорбентом Synergi Hydro C18. Контроль сорбции показал отсутствие проскока НДМГ-дБФЗ в собранных с колонки фракциях вплоть до 105 мл. Скорость подачи раствора пробы ограничивается лишь давлением в концентрирующей колонке и может составлять 4 – 5 мл/мин (в этих условиях  $p = 75$  бар).

При установке колонки для концентрирования в качестве разделяющей на хроматограмме зарегистрировали пик НДМГ-дБФЗ, интервал времени удерживания которого составил 2.4 – 4.9 мин при скорости подачи элюента 1 мл/мин. Подвижная фаза по составу соответствовала выбранной ранее для хроматографического определения НДМГ-дБФЗ: 0,02 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 4,0) с 50% ацетонитрила. Таким образом, при десорбции подвижной фазой достигается количественное извлечение производного НДМГ ( $96 \pm 6$  %). Для наилучшего разделения с сопутствующими компонентами выбран режим обратного элюирования, в случае которого концентрат претерпевает дополнительное разделение при прохождении через слой сорбента в концентрирующей колонке.

Подход, сочетающий on-line концентрирование пробы, промывку колонки водой для удаления реагента и элюирование концентрата в систему разделения обеспечил высокую чувствительность определения НДМГ и успешное разделение компонентов пробы. Хроматограмма пробы, содержащей 20 нг/л НДМГ, представлена на рис. 34. Предел обнаружения НДМГ составил 2 нг/л при обработке 100 мл пробы, линейность сохраняется в диапазоне 5 – 1000 нг/л. Относительная погрешность не превышала 40 %. Метрологические характеристики определения НДМГ приведены в табл. 10.

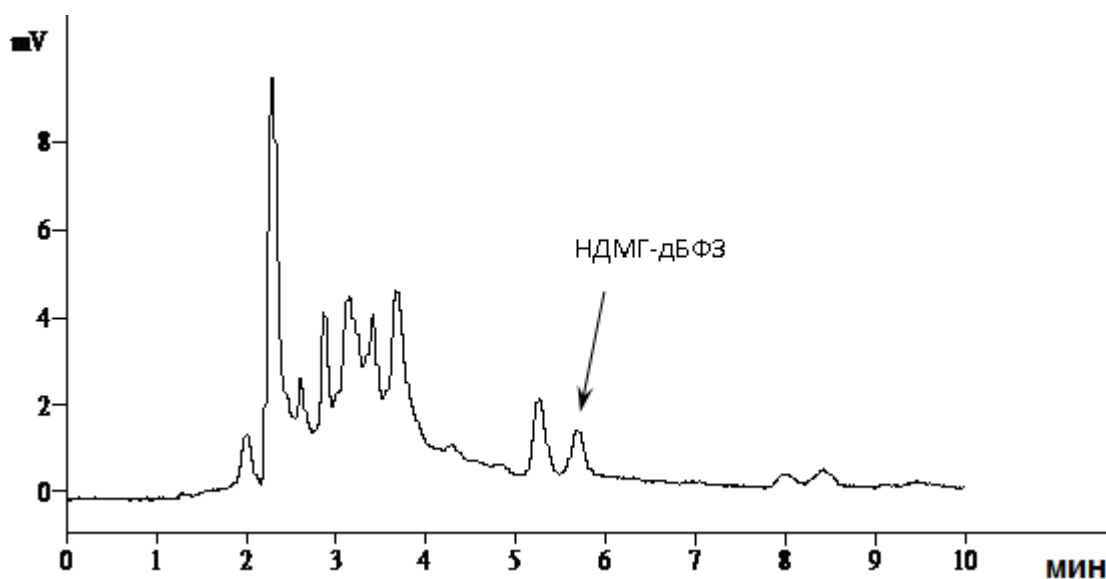


Рисунок 34 – On-line сорбционно-хроматографическое определение НДМГ.  $C_{\text{НДМГ}}=20$  нг/л. Концентрирующая колонка Synergi Hydro C18 (4×50 мм). Разделяющая колонка Zorbax SB-C18 (4.6×150 мм). Подвижная фаза: 0,02М фосфатный буферный раствор (pH 4.0), 50% ацетонитрила. Спектрофотометрический детектор,  $\lambda_{\text{погл.}}=550$  нм.

Мешающее влияние на определение НДМГ могут оказывать гидразины и амины. Максимумы поглощения дБФЗ-производных гидразина и монометилгидразина смещены в длинноволновую область по сравнению с НДМГ-дБФЗ, и в выбранных условиях сорбционно-хроматографического определения имеют малые времена удерживания, приближенные ко времени удерживания реагента, поэтому не мешают определению НДМГ. Присутствующий в природной воде диметиламин (ДМА) как один из продуктов разложения НДМГ также



образует производное с дБФЗ, поэтому может затруднять определение следов диметилгидразина.

Изучено взаимодействие ДМА с дБФЗ в условиях образования производного НДМГ. Образующийся продукт ДМА-дБФЗ имеет максимум поглощения при 480 нм, как и большинство аминов, описанных в работах. При длине волны детектирования НДМГ-дБФЗ (550 нм) регистрируется лишь слабый сигнал даже при высокой концентрации ДМА: площадь пика  $S_{\text{ДМА-дБФЗ}} = 20 \text{ мВ}\cdot\text{с}$  для 500 мг/л ДМА. Для разделения продуктов ДМА и НДМГ изменили содержание органического растворителя в подвижной фазе до 48%, используя при этом десорбцию обратным потоком элюента, что позволило хроматографически разделить производные диметиламина и диметилгидразина. Хроматограмма смеси 0,02 мкг/л НДМГ и 0,1 мг/л ДМА после on-line сорбционно-хроматографического определения представлена на рис. 35.

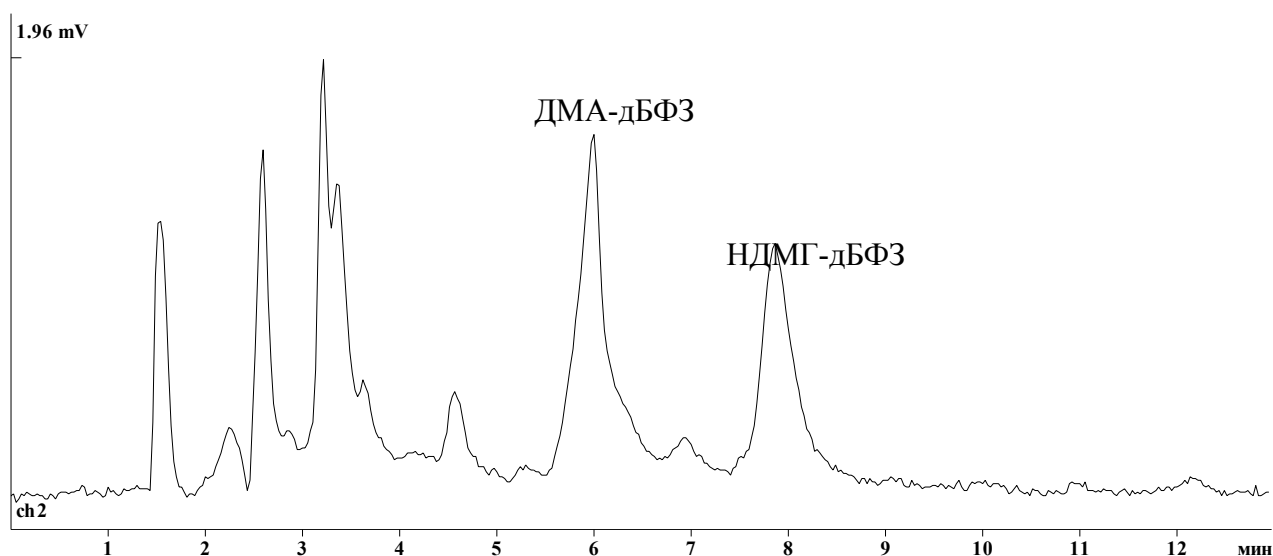


Рисунок 35 – On-line сорбционно-хроматографическое определение смеси 0,02 мкг/л НДМГ и 0,1 мг/л ДМА. Концентрирующая колонка Synergi Hydro C18 (4×50 мм). Разделяющая колонка Zorbax SB-C18 (4.6×150 мм). Подвижная фаза: 0,02М фосфатный буферный раствор (рН 4.0), 48% ацетонитрила.

Спектрофотометрический детектор,  $\lambda_{\text{погл.}} = 550 \text{ нм}$ .

Таким образом, ДМА не мешает в случае дериватизации НДМГ с дБФЗ, поскольку продукты имеют разные максимумы поглощения, а также разделены хроматографически.

Применимость разработанной методики определения НДМГ к анализу реальных образцов проверена методом «введено-найдено» для синтетических образцов, полученных добавлением диметилгидразина в природную воду. Хроматограмма такого синтетического образца воды с дополнительной добавкой диметиламина представлена на рис. 36. Результаты определения НДМГ на фоне матриц природных объектов, подтверждающие правильность методики, приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты определения НДМГ в синтетических образцах воды (n = 3, P = 0.95)

Введено, нг/л	Найдено, нг/л
20	19 ± 4
50	52 ± 6
500	480 ± 50
3000	2900 ± 200

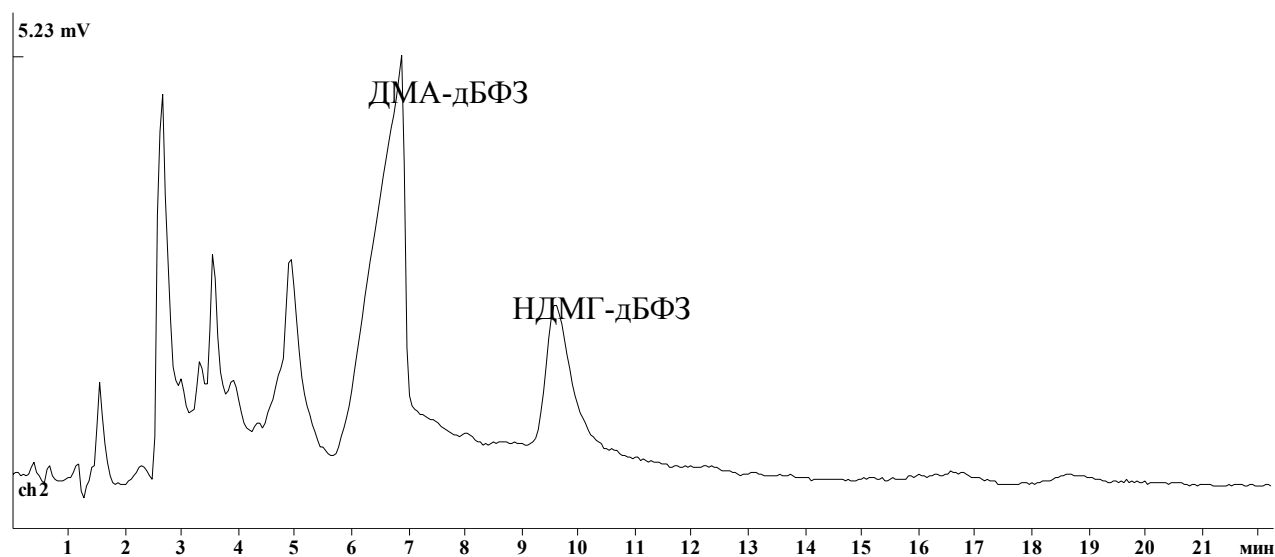


Рисунок 36 – On-line сорбционно-хроматографическое определение образца природной воды с добавкой 0,05 мкг/л НДМГ и 500 мг/л ДМА. Концентрирующая колонка Synergi Hydro C18 (4×50 мм). Разделяющая колонка Zorbax SB-C18 (4,6×150 мм). Подвижная фаза: 0,02М фосфатный буферный раствор (рН 4.0), 48% ацетонитрила. Спектрофотометрический детектор,  $\lambda_{\text{погл.}} = 550 \text{ нм}$ .

Таким образом, наиболее чувствительным и селективным модификатором для сорбционно-хроматографического определения НДМГ оказался 4-хлор-5,7-динитробензофуразан, в случае которого селективность обеспечивается положением максимума поглощения производного НДМГ в области длинных волн и возможностью удаления примесей на стадии сорбционного концентрирования. Предел обнаружения НДМГ ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием с предварительным динамическим on-line концентрированием составили 2 нг/л. Разработана методика, позволяющий определять НДМГ в природных водах согласно требованиям ГН 2.1.5.2307-07. Простота и экспрессность дериватизации, автоматизация анализа, возможность удаления реагента и сочетание с подходящей системой разделения обеспечивают простое в исполнении высокочувствительное определение НДМГ.

Разработанная методика позволяет осуществлять контроль содержания НДМГ в водоемах хозяйственно-бытового назначения на уровне нового ОДУ. Достигнутый в работе предел обнаружения НДМГ является на данный момент минимальными по сравнению с другими известными способами определения гидразинов.

Таким образом, разработана методика определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии, обеспечивающая определение целевого компонента при содержании в интервале не выше 5 и не ниже 1000 нг/л (*в ТЗ – не выше 5 и не ниже 1000 нг/л*) с относительной погрешностью не выше 40 % (*в ТЗ – не выше 40 %*).

2.7. Разработка методики определения пенициллиновых антибиотиков в пищевых продуктах, методики определения 1-нафтиламина в биологических жидкостях.

*Реакция бромирования родамина с флуориметрическим контролем скорости и методика определения бензилпенициллина.* Восстановителем в реакции с НБС служил родамин 6Ж. Предполагали, что бромирование будет уменьшать сигнал флуоресценции красителя ( $\lambda_{\text{ex}} = 550$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 590$  нм). При вводе в систему НБС сигнал действительно уменьшается во времени; при увеличении концентрации

НБС сигнал также падает. С наибольшей скоростью реакция протекает в щелочной среде, однако в этом случае сигнал не меняется во времени и не зависит от присутствия органических соединений, поэтому проводили реакцию при нейтральном рН, при котором это влияние заметно. Для получения воспроизводимого сигнала требуется не менее чем за 1 мин до начала реакции смешивать НБС с определяемым соединением.

Индикаторную реакцию родамина 6Ж с N-бромсукцинимидом проводили в воде. Для проведения контрольного опыта в кювету при помощи дозатора помещали 200 мкл  $1 \cdot 10^{-5}$  М водного раствора родамина 6Ж и 240 мкл ацетатного буфера с рН 4.5; а в пробирку – 1160 мкл воды и 400 мкл  $5 \cdot 10^{-4}$  М водного раствора N-бромсукцинимиды (общий объём 2000 мкл). Затем приливали раствор из пробирки в кювету и сразу же регистрировали кинетические кривые при длине волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 480$  нм и длине волны регистрации  $\lambda_{em} = 537$  нм в течение 1 мин, после чего записывали спектр люминесценции при той же длине волны возбуждения.

Реакции с модельными соединениями проводили аналогичным способом с тем лишь отличием, что вместо воды в пробирку вводили 200 мкл раствора соединения исследуемой концентрации.

Первая задача работы с реакцией НБС – родамин состояла в изучении влияния соединений различных классов. Как было показано нами ранее, на протекание реакции восстановления НБС другим красителем, метиловым фиолетовым, влияют соединения с бензильным радикалом  $Ar-CH_2-$  (бензиловый спирт, бензиламин, бензилпенициллин), анилин, способный бромироваться в ароматическое кольцо, а также, в меньшей степени,  $HS-$  и  $-C=S$  соединения (цистеин, тиомочевина) и амины. Такой набор соединений согласуется с приведенными выше литературными данными о реакциях бромирования, за тем исключением, что не влияют на скорость реакции ненасыщенные соединения (хинон и акриламид). Триэтилбензиламмоний мог бы бромироваться по метиленовой группе, однако кватернизованный атом азота, вероятно, препятствует стабилизации образующегося  $SN$ -радикала.

В реакции бромирования родамина удастся наблюдать влияние тех же соединений, что и в реакции НБС – метиловый фиолетовый (табл. 12), хотя есть и

исключение: в первой из реакций не влияет бензиловый спирт. Определение бензильных производных представляет особый интерес, поскольку для них кинетические методы не описаны.

Таблица 12 – Минимальные концентрации соединений, моль/л, влияющие на скорость реакций бромирования *N*-бромсукцинимидом (НБС).

Соединение	Реакция	
	НБС – фиолетовый	метиловый НБС – родамин 6Ж
Бензиловый спирт	$1 \cdot 10^{-6}$	Не влияет
Анилин	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-7}$
Бензиламин гидрохлорид	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$
Бензилпенициллин	$5 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$
1-Нафтиламин	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Метиламин	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Бензоат натрия	Не влияет	Не влияет
<i>m</i> -Бензохинон	Не влияет	—*
Триэтилбензил-аммония хлорид	Не влияет	—
Акриламид	Не влияет	—

\* Прочерк – не изучено

Индикаторная реакция родамина 6Ж с *N*-бромсукцинимидом проводилась в воде. Для контрольного опыта в кювету при помощи дозатора помещали 200 мкл  $1 \cdot 10^{-5}$  М водного раствора родамина 6Ж и 240 мкл ацетатного буфера с рН 4.5; а в пробирку – 1160 мкл воды и 400 мкл  $5 \cdot 10^{-4}$  М водного раствора *N*-бромсукцинимидом (общий объём 2000 мкл).

Выбор условий проведения реакции. Требовалось выбрать условия, в которых реакция протекала бы с измеримой скоростью. Сначала изучили влияние рН буферного раствора на скорость реакции. Использовали ацетатный буфер с рН

3.5–4.5 (0.4 М по ацетату); фосфатный буфер с рН 7.0 (1/15 М по фосфату) и боратный буфер с рН 9.2 (0.05 М тетраборат натрия).

Скорость реакции в ацетатном буфере рН 3.5 была слишком велика для измерения (табл. 13), поэтому изучили влияние ацетатного буфера с рН 4.0 и 4.5.

Таблица 13. Зависимость скорости реакции от рН буфера

Буфер	рН	tgα (1 мин)
Ацетатный	3.5	∞
Фосфатный	7	0.0074
Боратный	9.2	0.00
Ацетатный	4	0.013
Ацетатный	4.5	0.018

Из табл. 13 видно, что при использовании боратного буфера с рН 9.2 реакция не протекает вообще, при использовании фосфатного буфера с рН 7 реакция идет, но с меньшей скоростью. Наиболее удобный для измерения наклон кинетической кривой наблюдается при использовании ацетатного буфера с рН 4.5. Этот буфер и использовали в дальнейшем.

Далее было проведено исследование влияния концентрации НБС на скорость индикаторной реакции. Исследование проводили согласно описанной выше методике. При варьировании концентрации НБС были зарегистрированы спектры флуоресценции и кинетические кривые (рис. 37).

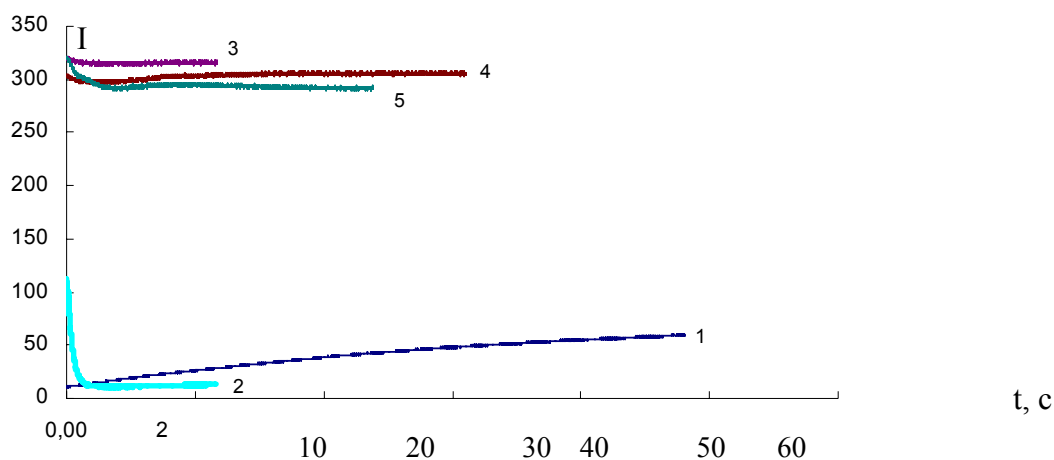


Рисунок 37 – Влияние концентрации НБС (М) на вид кинетической кривой:

1 -  $1 \cdot 10^{-4}$ ; 2 -  $3 \cdot 10^{-5}$ ; 3 -  $1 \cdot 10^{-5}$ ; 4 -  $3 \cdot 10^{-6}$ ; 5 -  $1 \cdot 10^{-6}$ .

Из всех приведенных кривых (рис. 37) нас в наибольшей степени интересует кривая 1, т.к. она сохраняет свой наклон в течение всего времени измерения (1 мин), т.е. для характеристики влияния аналита на скорость реакции бромирования родамина 6Ж удобнее всего использовать концентрацию НБС  $1 \cdot 10^{-4}$  М.

Также зарегистрировали спектры люминесценции для разных концентраций НБС в зависимости от времени (рис. 38).

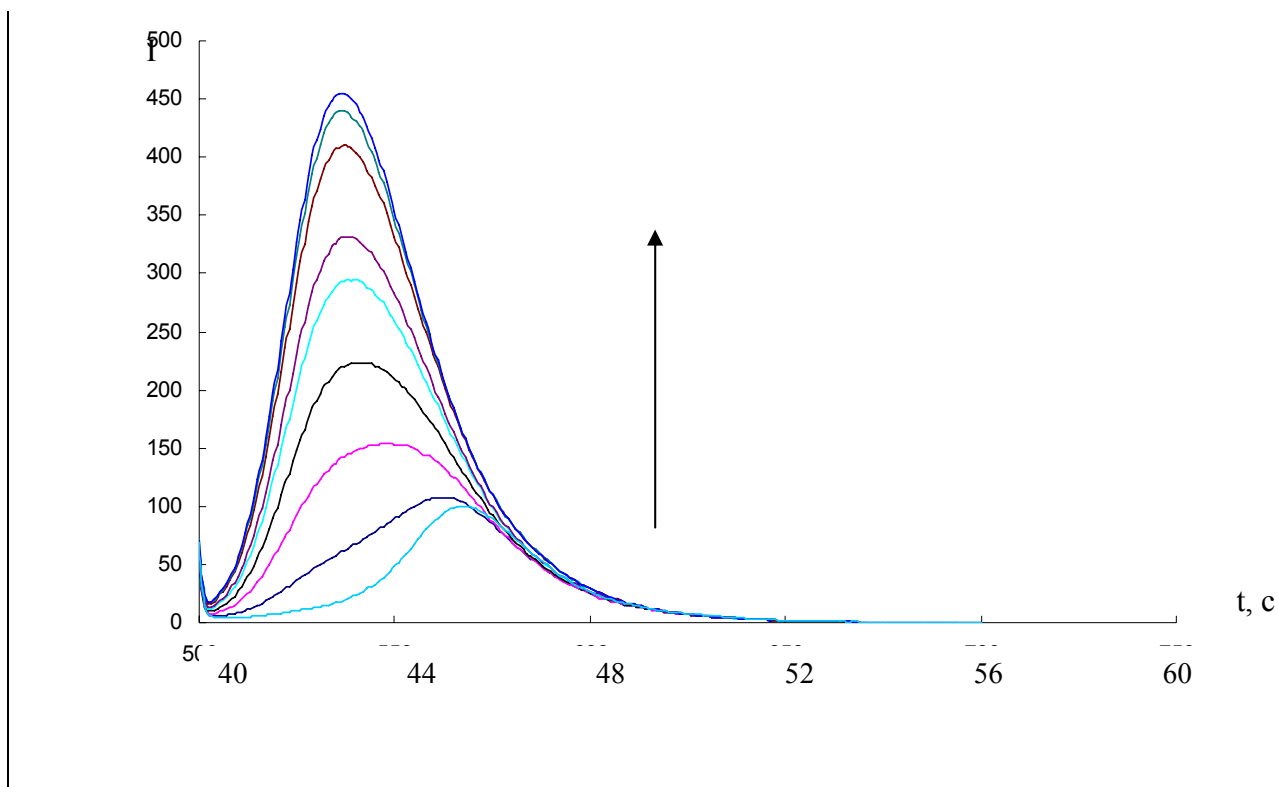


Рисунок 38 – Спектры люминесценции для смеси НБС  $3 \cdot 10^{-4}$  М и Rhod  $1 \cdot 10^{-6}$  М, зарегистрированные с интервалом в одну минуту.

Видно, что максимум люминесценции Rhod по мере развития реакции смещается в коротковолновую область – от 570 нм к 537 нм, что обусловлено, вероятно, образованием различных бромпроизводных родамина 6Ж (моно-, ди-, три- и тетрабромпроизводных). В дальнейшем длина волны 537 нм была выбрана в качестве рабочей.

В ходе дальнейшего выбора условий варьировали концентрации Rhod и НБС, в том числе уменьшили на порядок (Rhod с  $1 \cdot 10^{-6}$  до  $1 \cdot 10^{-7}$  М) и использовали концентрации НБС с  $1 \cdot 10^{-7}$  до  $3 \cdot 10^{-5}$  М. Были зарегистрированы спектры флуоресценции для всех концентраций НБС (рис. 39).

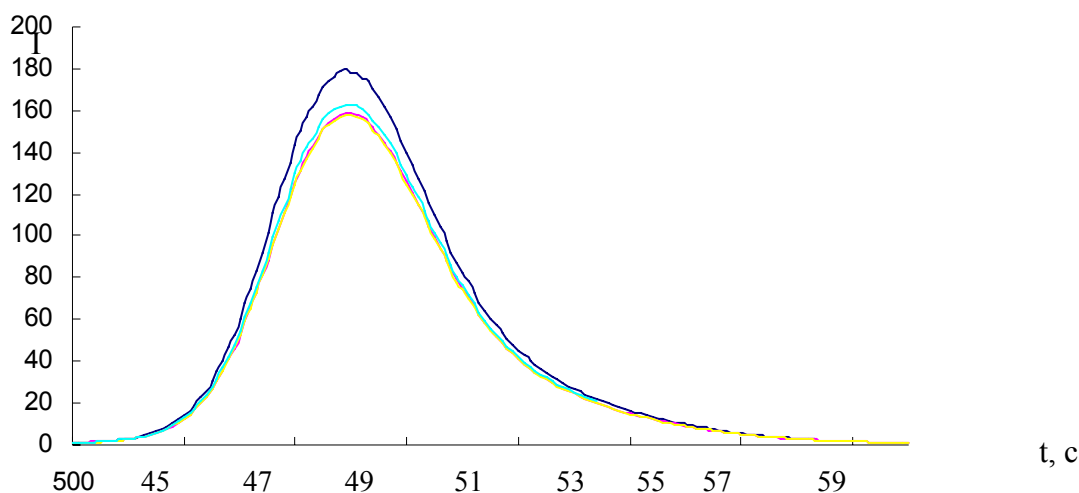


Рисунок 39 – Спектры флуоресценции для смеси НБС  $3 \cdot 10^{-6}$  М и Rhod  $1 \cdot 10^{-7}$  М; интервал времени между регистрацией спектров – 1 мин.

Из рис. 3 видно, что реакция проходит практически мгновенно – спектры флуоресценции через равные промежутки времени (по 1 мин) почти совпадают. Для всех концентраций НБС также наблюдается сдвиг максимума флуоресценции в коротковолновую область, однако не до 537, а до 550 нм. Видимо, при малых концентрациях родамина бЖ образуется другой набор продуктов его бромирования.

Среди предыдущих спектров флуоресценции (рис. 38) можно обнаружить спектр с максимумом флуоресценции при 550 нм (третья кривая снизу). На основании этого можно сделать предположение, что при понижении концентрации Rhod с  $1 \cdot 10^{-6}$  до  $1 \cdot 10^{-7}$  М реакция бромирования родамина бЖ проходит менее полно.

Таким образом, выбрали оптимальные условия измерения скорости реакции бромирования родамина бЖ: ацетатный буфер с pH 4.5; Rhod  $1 \cdot 10^{-5}$  М; НБС  $1 \cdot 10^{-4}$  М. В дальнейшем мы придерживались этих условий.

Далее изучали влияние модельных соединений на скорость реакции бромирования родамина бЖ. В качестве первых модельных соединений были выбраны: мочеви́на, бензиловый спирт, анилин, бензиламин и гидрохинон. Для них были зарегистрированы кинетические кривые (рис. 40).



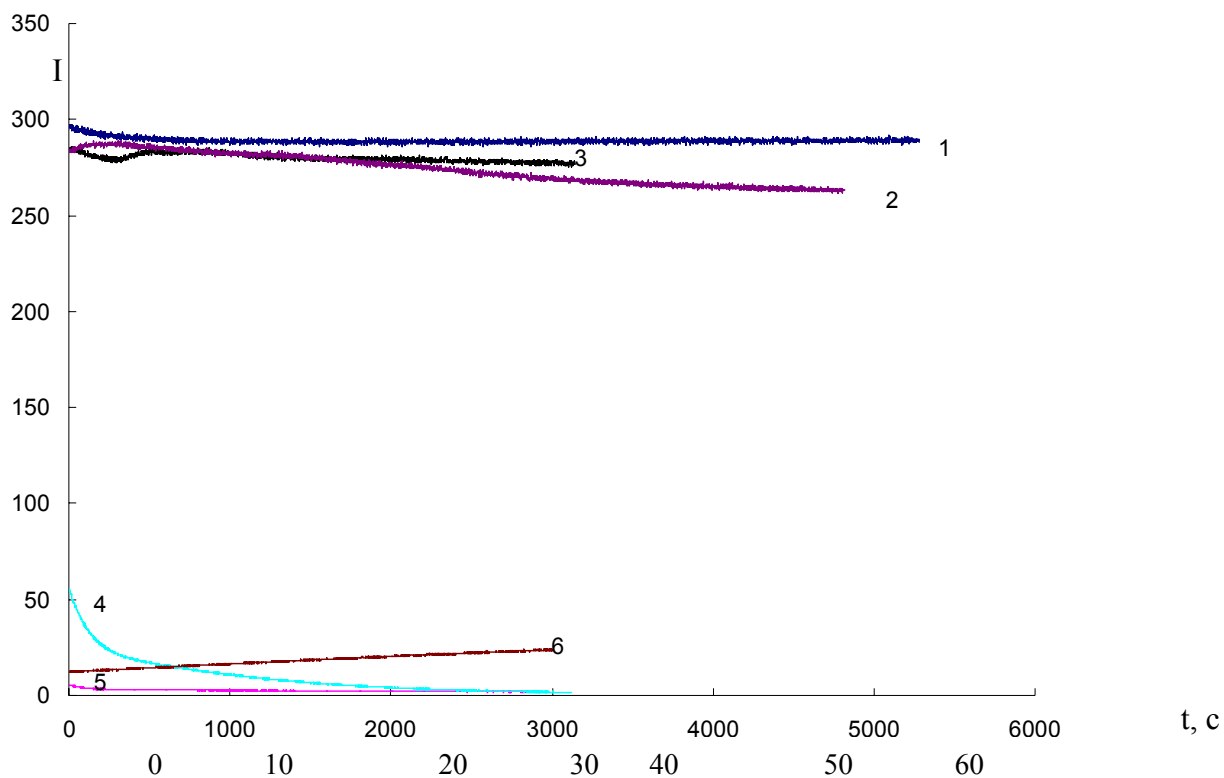


Рисунок 40 – Кинетические кривые реакции бромирования родамина 6Ж в присутствии модельных соединений: 1 - мочевины  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 2 - бензиловый спирт  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 3 - анилин  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 4 - бензиламин  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 5 - гидрохинон  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 6 - контрольный опыт (без модельного соединения); везде Rhod  $1 \cdot 10^{-6}$  М, НБС  $1 \cdot 10^{-4}$  М.

Судя по наклону и форме кривых 1, 3 и 5, реакция проходит мгновенно. Из рис. 40 видно, что ближе всего к контрольному опыту оказались кривые бензиламина и бензилового спирта, то есть соединений с бензильным заместителем.

Было исследовано влияние этих соединений на скорость реакции бромирования подробнее. Были зарегистрированы кинетические кривые для выбранных концентраций бензиламина и бензилового спирта (рис. 41).

Из рис. 41 видно, что все концентрации обоих модельных соединений измеримо влияют на скорость реакции, изменяя ее по сравнению со скоростью в контрольном опыте. По данным рис. 41 сделаны оценки минимальных концентраций, влияющих на скорость реакции ( $c_{\min}$ ) для бензилового спирта и бензиламина; это величины, приблизительно равные  $1 \cdot 10^{-6}$  М.

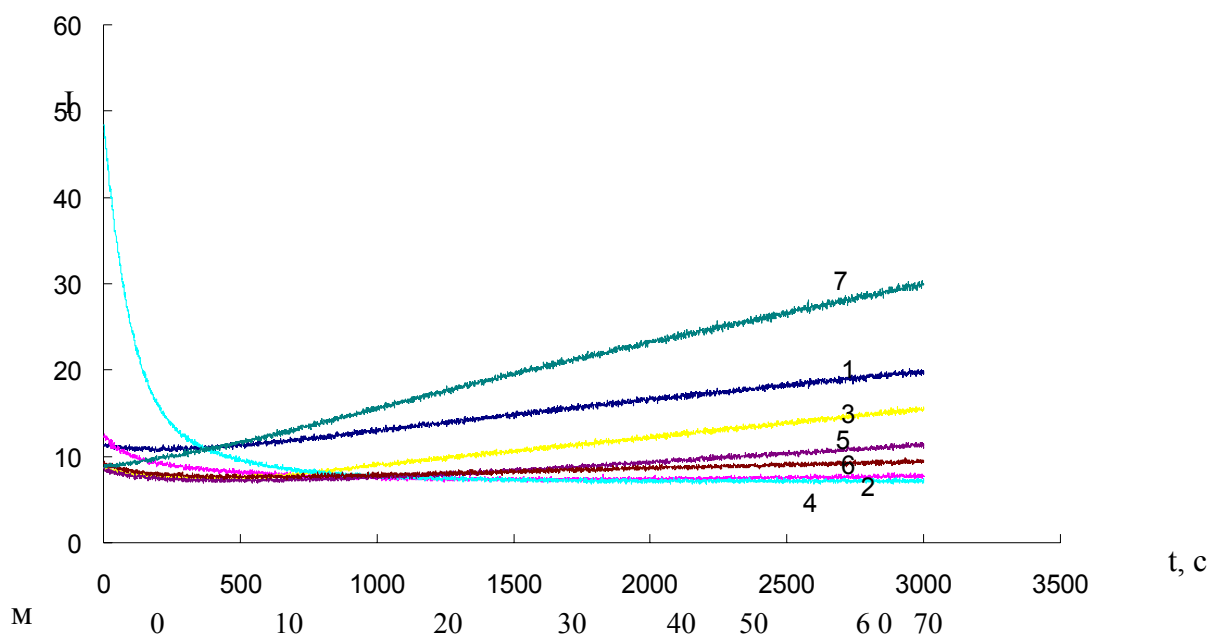


Рисунок 41 – Кинетические кривые реакции бромирования родамина 6Ж в присутствии модельных соединений: 1 - бензиловый спирт  $1 \cdot 10^{-4}$  М; 2 - бензиловый спирт;  $1 \cdot 10^{-5}$  М; 3 - бензиловый спирт  $1 \cdot 10^{-6}$  М; 4 - бензиламин  $1 \cdot 10^{-4}$  М; 5 - бензиламин  $1 \cdot 10^{-5}$  М; 6 - бензиламин  $1 \cdot 10^{-6}$  М; 7 - контрольный опыт (без модельного соединения); Rhod  $1 \cdot 10^{-6}$  М; НБС  $1 \cdot 10^{-4}$  М.

Далее было исследовано влияние таких модельных соединений, как бензохинон и акриламид. Из рис. 42 видно, что изученные концентрации модельных соединений измеримо влияют на контрольный опыт; высокая интенсивность сигнала в первой кривой обусловлена использованием больших щелей монохроматора прибора, остальные кривые зарегистрированы при более узких щелях (3/3 нм, возб./регистр.).

Таким образом, были определены значения  $c_{min}$  для бензохинона и акриламида, равные  $1 \cdot 10^{-4}$  М.

Далее было изучено влияние бензилпенициллина, которое также могло бы бромироваться из-за присутствия бензильного заместителя (рис. 43).

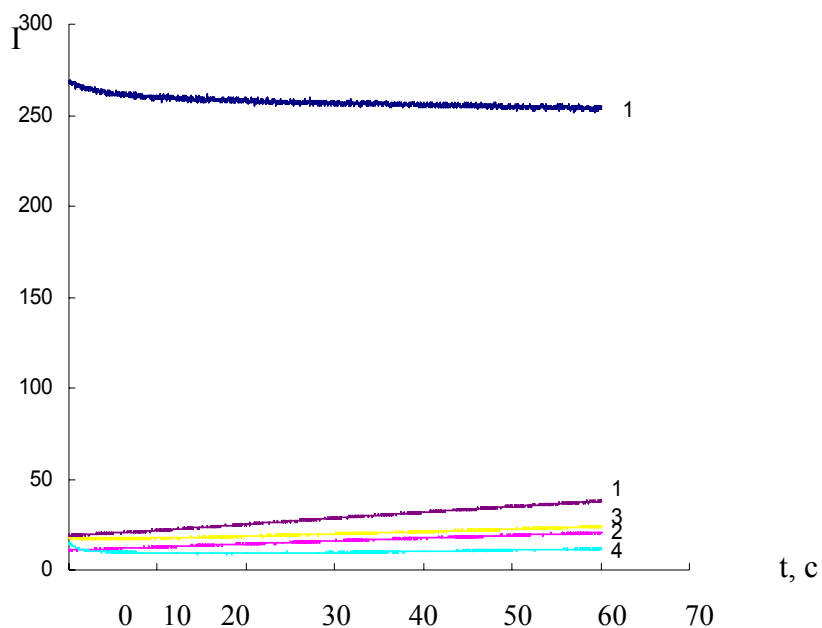


Рисунок 42 – Кинетические кривые реакции бромирования родамина БЖ в присутствии модельных соединений: 1 - бензохинон  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 2 - бензохинон  $1 \cdot 10^{-4}$  М; 3 – акриламид  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 4 - акриламид  $1 \cdot 10^{-4}$  М; 5 - контрольный опыт (без модельного соединения); Rhod  $1 \cdot 10^{-6}$ , НБС  $1 \cdot 10^{-4}$  М.

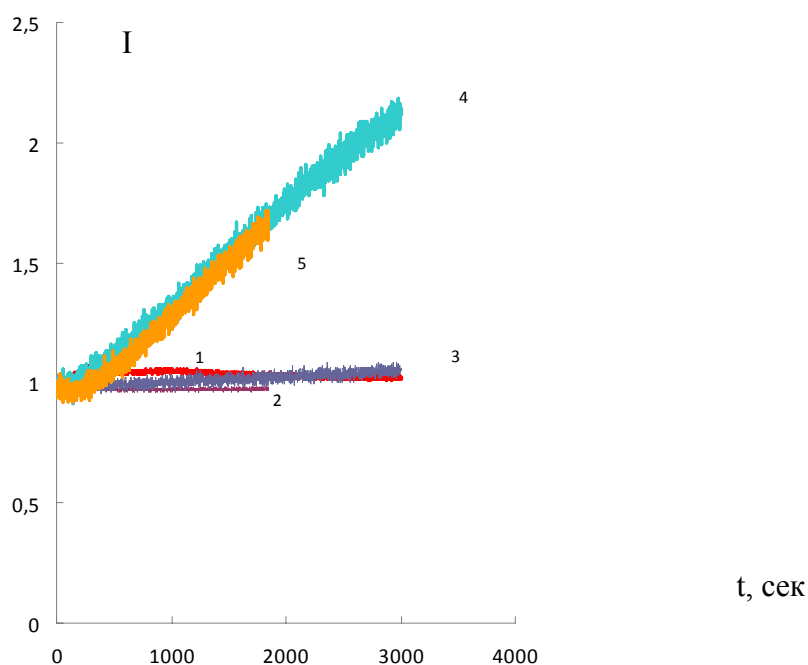


Рисунок 43 – Кинетические кривые реакции бромирования родамина БЖ в присутствии бензилпенициллина (М): 1 -  $1 \cdot 10^{-3}$ ; 2 -  $1 \cdot 10^{-4}$ ; 3 -  $1 \cdot 10^{-5}$ ; 4 -  $1 \cdot 10^{-6}$ ; 4 – 0.

Из рис. 43 видно, что бензилпенициллин в интервале концентраций  $1 \cdot 10^{-3}$  -  $1 \cdot 10^{-5}$  М ингибирует реакцию, а при концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$  М не влияет на ее скорость. Далее исследовали влияние бензилпенициллина на скорость реакции при концентрациях, близких к  $1 \cdot 10^{-6}$  М (рис. 44).

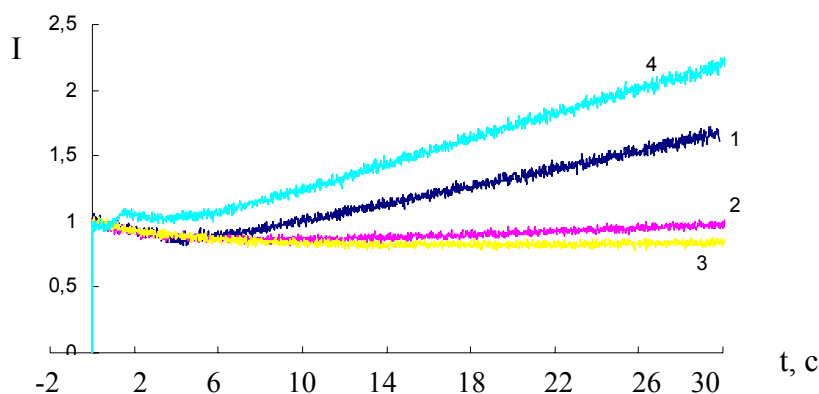


Рисунок 44 – Нормированные кинетические кривые влияния различных концентраций бензилпенициллина (М) на скорость реакции бромирования родамина 6Ж: 1 -  $2 \cdot 10^{-6}$ ; 2 -  $5 \cdot 10^{-6}$ ; 3 -  $8 \cdot 10^{-6}$ ; 4 – 0.

Результаты приведены на рис. 44. Нормирование кинетических кривых проводили следующим образом: все значения интенсивности делили на интенсивность в нулевой момент времени, таким образом, все кинетические кривые выходят из значения по ординате, равного единице. В качестве характеристики скорости реакции использовали значение оптической плотности при фиксированном времени (15 с).

Из рис. 44 видно, что при концентрациях бензилпенициллина близких к  $1 \cdot 10^{-6}$  М он измеримо замедляет бромирование родамина 6Ж. Значения минимальных концентраций других модельных соединений, изученных в данной индикаторной реакции, приведены в табл. 14.

В найденных оптимальных условиях построили градуировочную зависимость для определения бензилпенициллина в водном растворе. Характеристики методики приведены в табл. 15.

Таблица 14 – Минимальные значения концентраций соединений (М), влияющие на скорость индикаторной реакции.

Акриламид	Бензохинон	Бензиловый спирт	Бензиламин	Бензилпенициллин
$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$

Таблица 15 – Характеристики градуировочной зависимости при определении бензилпенициллина в водном растворе по реакции бромирования родамина 6Ж.

$a^*$	$b^*$	R	$n$	$s_r$ (при $4 \cdot 10^{-6}$ М, $n = 5$ )	Диапазон определяемых концентраций, М	Предел обнаружения, М
-0,261	-0,136	0.97	6	0.07	$4 \cdot 10^{-6}$ – $2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$

\* Для уравнения вида  $y = ax + b$ , где  $y$  – начальная скорость реакции,  $x = \lg c_{\text{пениц}}$ .

*Определение бензилпенициллина в молоке.* В пробу коровьего молока объемом 30 мл дозатором вводят добавку водного раствора пенициллина (0, 2, 4, 6, 8 и 10 мкг антибиотика, что соответствует 0, 2, 4, 6,  $8 \cdot 10^{-7}$  и  $1 \cdot 10^{-6}$  М), помещают пробу в центрифужную пробирку, приливают 1 мл конц. HCl и центрифугируют в течение 20 мин при скорости 6000 об/мин. К центрифугату добавляют 15 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , отстаивают 5 мин, затем вновь центрифугируют в течение 20 мин. Центрифугат фильтруют через двойной бумажный фильтр «синяя лента». Далее концентрируют аналит методом твердофазной экстракции на патроне «Диapak-карбокci», пропуская весь объем полученного раствора через предварительно кондиционированный патрон. После окончания пропускания патрон продувают воздухом для удаления остатков матричного раствора и десорбируют аналит с помощью 1.5 мл 0.1 М раствора соляной кислоты. Из полученного раствора отбирают 1 мл и вводят в реакцию по вышеописанной методике. Строят зависимость аналитического сигнала от исходной концентрации антибиотика в молоке. Характеристики градуировочной зависимости приведены в табл. 16.

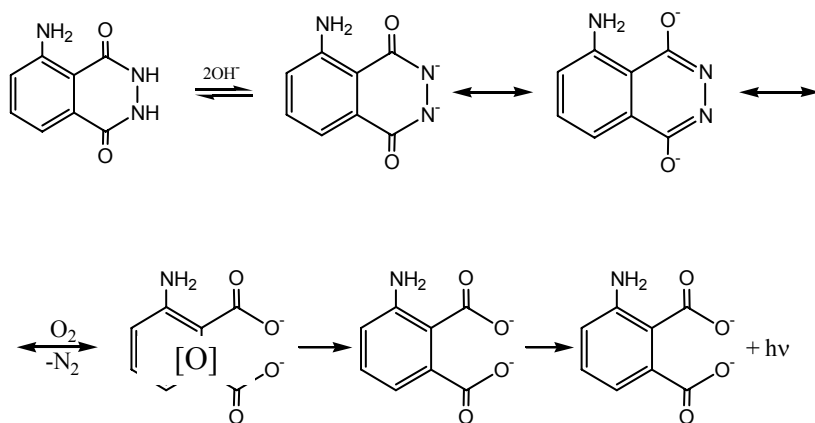
Таблица 16 – Характеристики градуировочной зависимости при определении бензилпенициллина в коровьем молоке кинетическим методом по реакции бромирования родамина 6Ж после сорбционного концентрирования.

$a^*$	$b^*$	R	$n$	$s_{\Gamma}$ (для $5 \cdot 10^{-7}$ М, $n = 5$ )	Диапазон определяемых концентраций в молоке, М	Предел обнаружения, М
-0,248	-0,130	0.98	7	0.08	$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-7}$

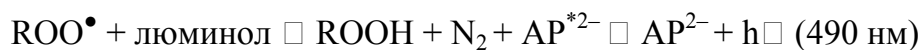
\* См. табл. 4.

Из сравнения данных табл. 15 и 16 можно видеть, что наклон градуировочной зависимости в присутствии молока уменьшается на 5%, что можно связать с частичной потерей антибиотика в ходе створаживания молока, а также с возможным влиянием растворимых компонентов молока на аналитический сигнал. В любом случае можно заключить, что степень извлечения бензилпенициллина из молока составляет не менее 95%. Предел обнаружения бензилпенициллина в молоке кинетическим методом после сорбционного концентрирования составляет  $1 \cdot 10^{-7}$  М.

*Реакция автоокисления люминола в присутствии азодиизобутирамидина (АДБА) с флуориметрическим контролем скорости и методика определения 1-нафтиламина.* Используемая в данной работе индикаторная реакция заключается в окислении люминола кислородом воздуха, проводимом с помощью азоинициатора (АДБА). При окислении люминола образуется 3-аминофталат-ион в возбужденном состоянии, который, переходя в основное состояние, испускает квант света с длиной волны около 490 нм:



Процесс начинается с фотолиза азосоединения по следующей схеме:



где AP – 3-аминофталат.

Вещества, способные реагировать с образующимися в этой системе радикалами, должны влиять на интенсивность флуоресценции.

*Выбор условий проведения реакции.* Были сняты спектры возбуждения флуоресценции смеси люминола и АДБА (рис. 45), при этом регистрацию проводили при длине волны 490 нм испускания 3-аминофталата.

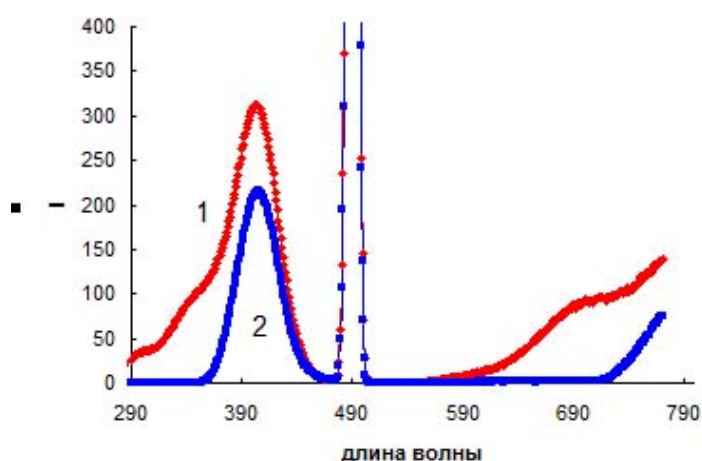


Рисунок 45 – Спектры возбуждения в системе  $1 \times 10^{-6}$  М люминол + 0.1 М АДБА (длина волны регистрации 490 нм): 1 – без УФ-светофильтра, 2 – с УФ-светофильтром

Был использован светофильтр, отсекающий УФ-область спектра. Это было вызвано тем, что используемая в качестве монохроматора дифракционная решетка флуориметра дает дополнительные полосы с длинами волн, равными  $\lambda/2$  и  $2\lambda$ , где  $\lambda$  – установленная длина волны. При использовании светофильтра сигнал немного уменьшается, но вид спектра принципиально не изменяется, что подтверждает, что система поглощает свет заданной длины волны (400, а не 400/2 нм). Исходя из полученных данных, для дальнейших измерений выбрали длину волны возбуждения 400 нм.

Согласно литературным данным, реакция окисления люминола без участия инициаторов проходит в щелочной среде. При проведении же окисления люминола в присутствии АДБА в щелочной среде получен следующий результат (рис. 46).

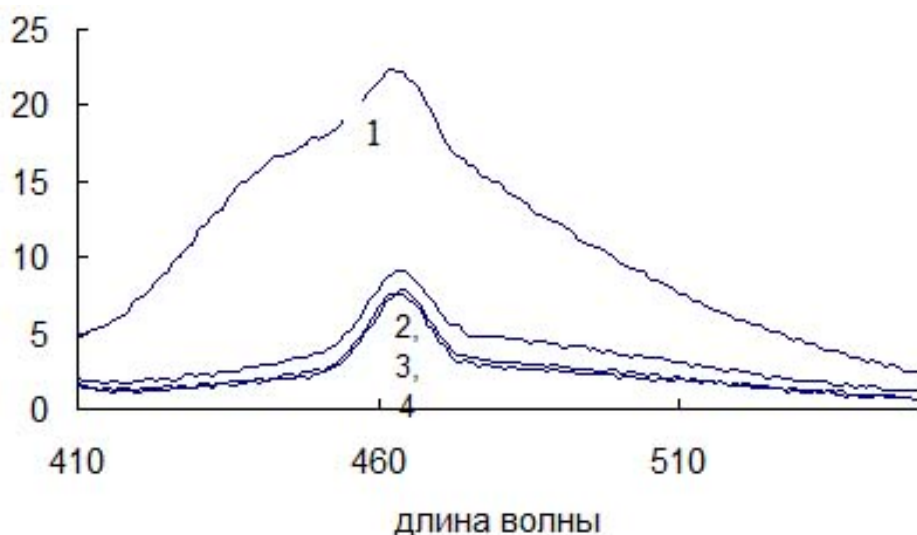


Рисунок 46 – Зависимость интенсивности люминесценции  $1 \times 10^{-4}$  М люминола от pH в щелочной среде: 1 – pH 9.2, 2 – pH 10.2, 3 – pH 10.4, 4 – pH 12;  $1 \times 10^{-4}$  М АДБА.

Как видно из рис. 46, в щелочной среде протекает процесс другой природы, чем в кислой, поскольку при  $\text{pH} > 9$  скорость реакции мала и образуется другой продукт: полоса при 465 нм, вероятно, не принадлежит 3-аминофталату, имеющему максимум люминесценции при 495 нм.

Если же для проведения реакции использовать слабокислую среду, аналогичную использованной нами при изучении реакций автоокисления ТМБ,



получается иной результат. Так, исследована зависимость сигнала от концентрации люминола при рН 3.0 (рис. 47).

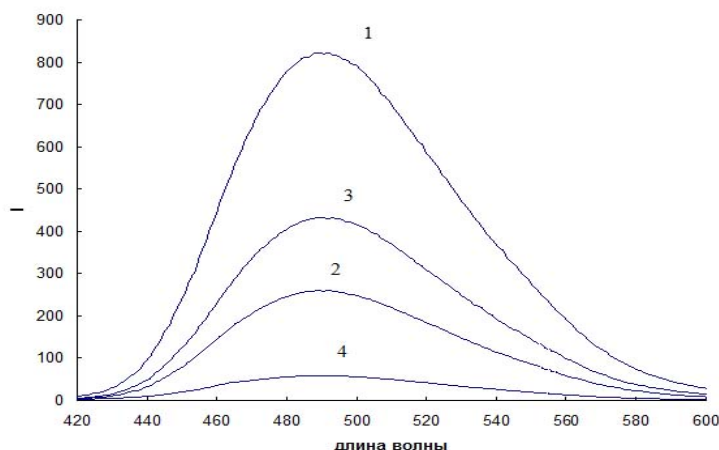


Рисунок 47 – Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации люминола, М: 1 -  $1 \times 10^{-6}$ , 2 -  $1 \times 10^{-7}$ , 3 -  $1 \times 10^{-8}$ , 4 -  $1 \times 10^{-9}$ . Концентрация АДБА – 0.1 М, ширина щелей возбуждения и поглощения – 5 нм.

Как видно из рис. 47, полученный пик соответствует длине волны флуоресценции 3-аминофталата (490 нм).

Изучение влияния модельных соединений. Исходя из всех полученных данных, для изучения влияния модельных соединений были выбраны следующие условия: люминол  $1 \cdot 10^{-6}$  М, АДБА 0.1 М, рН 3.0, ширина щелей возбуждения и поглощения – по 5 нм. Измерения проводили в кинетическом режиме, который показал более воспроизводимые результаты, чем режим получения спектров. Мерой скорости реакции служил тангенс угла наклона начального участка кинетической кривой. Кинетические кривые были получены в присутствии модельных соединений; во всех случаях они были прямолинейны в течение первых 5 с реакции. Это время и было выбрано для измерения скорости реакции.

Данные по влиянию модельных соединений на скорость реакции окисления люминола представлены в табл. 17. Влияют тиомочевина, диэтилдитиокарбамат натрия, 4-нитрофенол, 1-нафтиламин галловая кислота, цистеин, гидрохинон, бензиловый спирт, аскорбиновая кислота фенол, анилин, не влияют, глицин, акриламид, мочевины, бензоат натрия, метиламин, бензиламин, янтарная

кислота. В целом набор соединений, влияющий на скорость реакции, близок к таковому для реакции автоокисления ТМБ, что можно объяснить преимущественно с взаимодействием модельных соединений с пероксильными радикалами. Минимальные концентрации, влияющие на скорость реакции, ниже, чем в случае системы ТМБ – кислород. Возможно, это связано с тем, что именно в данной системе сигналом служит скорость реакции на начальном участке кинетической кривой.

Таблица 17 – Влияние модельных соединений на скорость реакции окисления люминола. Приведены минимальные влияющие концентрации соединений (с точностью до порядка).

Соединение	Минимальная концентрация, М
Бензиловый спирт	$10^{-3}$
Фенол	$10^{-4}$
4-Нитрофенол	$10^{-3}$
Гидрохинон	$10^{-6}$
Галловая кислота	$10^{-5}$
Бензоат натрия	$\geq 0.01^*$
Янтарная кислота	$\geq 0.01^*$
Аскорбиновая кислота	$10^{-5}$
Глицин	$\geq 0.01^*$
Цистеин	$10^{-3}$
Диэтилдитиокарбамат натрия	$10^{-4}$
Тиомочевина	$10^{-3}$
Мочевина	$\geq 0.01^*$
Акриламид	$\geq 0.01^*$
Метиламин	$\geq 0.01^*$
Бензиламин	$\geq 0.01^*$
Анилин	$10^{-4}$
1-Нафтиламин	$10^{-6}$

\* Не влияет в концентрации 0.01 М, более высокие концентрации не исследовали

*Определение 1-нафтиламина.* Для более подробного изучения был выбран 1-нафтиламин как соединение, наиболее сильно (наряду с гидрохиноном) влияющее на скорость реакции.

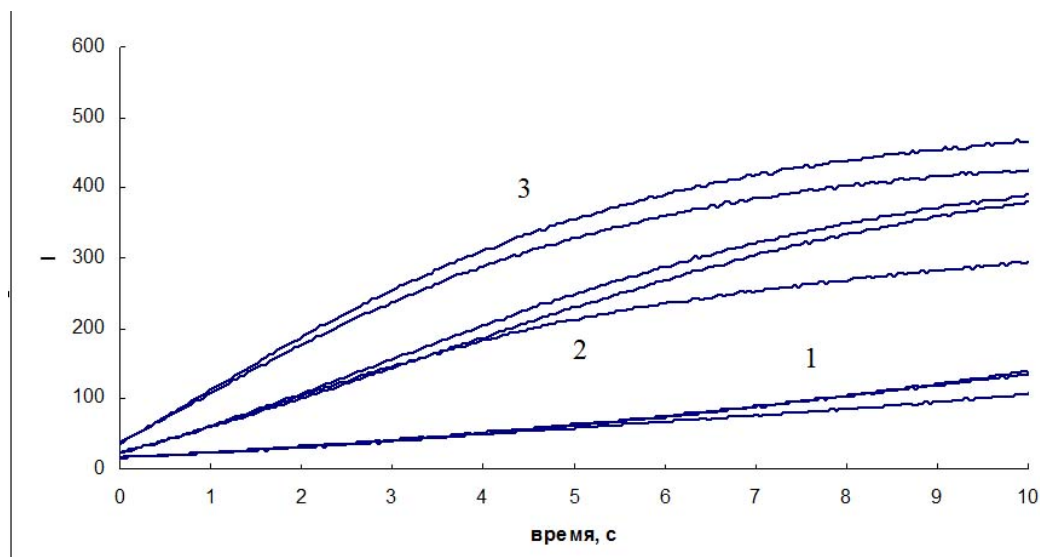


Рисунок 48 – Кинетические кривые для различных концентраций 1-нафтиламина: 1 –  $1 \times 10^{-5}$  М, 2 –  $1 \times 10^{-6}$  М, 3 – 0 (контрольный опыт)

Из кинетических кривых системы люминол – АДБА – 1-нафтиламин в присутствии 1-нафтиламина (рис. 48) видно, что начальные скорости реакции воспроизводимы, поэтому данная реакция может быть использована для разработки методики определения этого соединения.

Исследовано влияние концентраций АДБА и люминола на скорость реакции. Реакцию проводили в следующих условиях: ширина щелей возбуждения и поглощения – 10 и 5 нм, соответственно, концентрация 1-нафтиламина –  $1 \times 10^{-6}$  М, рН 3.0. Получены следующие результаты (рис. 49 и 50). При повышении концентрации люминола сигнал непрерывно возрастает, но усиливается и нестабильность показаний прибора, поэтому была выбрана компромиссная концентрация люминола ( $1 \cdot 10^{-6}$  М). Оптимальная концентрация азоинициатора составила 0.01 М.

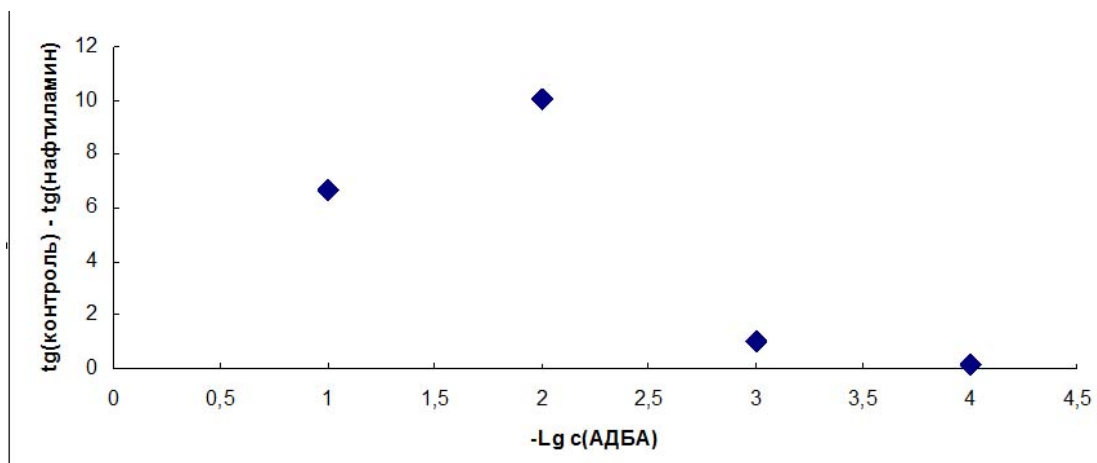


Рисунок 49 – Зависимость разницы тангенсов наклона кинетических кривых контрольной пробы и пробы, содержащей  $1 \times 10^{-6}$  М 1-нафтиламина, от концентрации АДБА при постоянной концентрации люминола ( $1 \times 10^{-6}$  М).

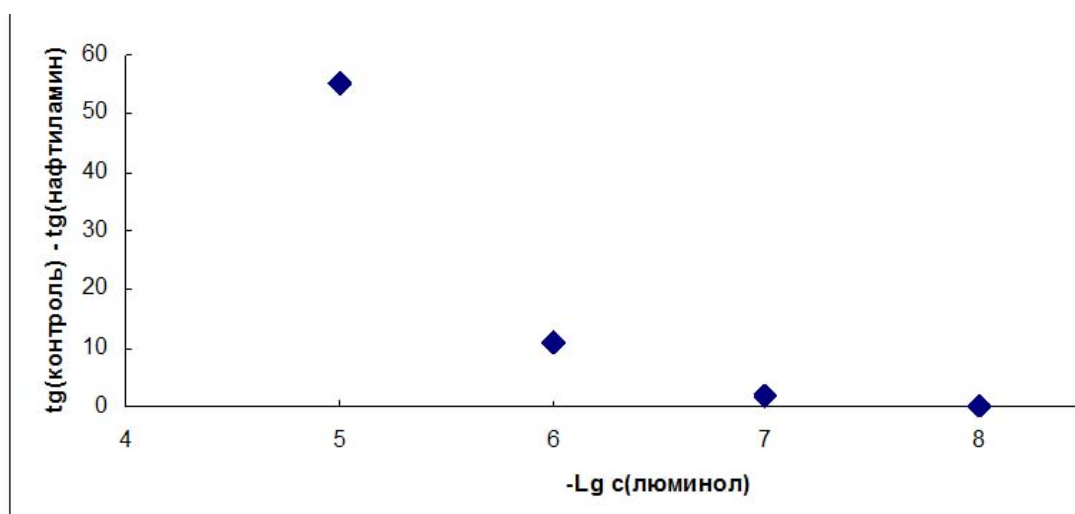


Рисунок 50 – Зависимость разницы тангенсов угла наклона кинетических кривых для контрольной пробы и пробы, содержащей  $1 \times 10^{-6}$  М 1-нафтиламина, от концентрации люминола при постоянной концентрации АДБА (0.01 М).

Зависимость скорости реакции от рН изучали в следующих условиях: концентрация люминола  $1 \times 10^{-6}$  М, концентрация АДБА 0.01 М. Получены следующие результаты (рис. 51)

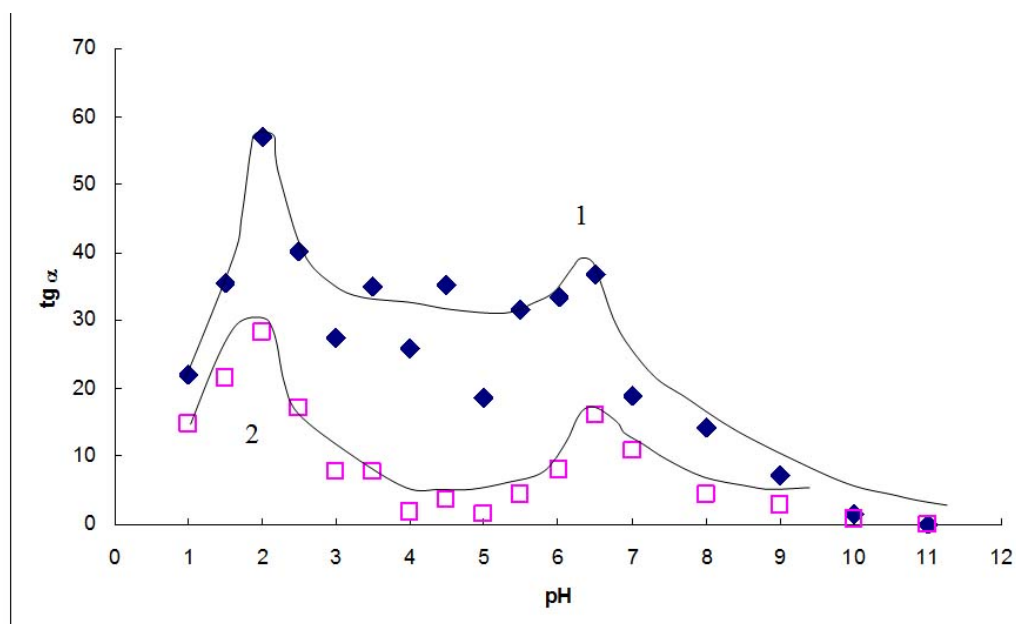


Рисунок 51 – Зависимость интенсивности люминесценции люминола от рН: 1 – контрольная проба, 2 – проба, содержащая  $1 \times 10^{-6}$  М 1-нафтиламина.

Концентрация АДБА 0.01 М, люминола  $1 \times 10^{-6}$  М.

В качестве оптимального значения был выбран рН 5.5, что определялось максимальной разницей между сигналом контрольной пробы и пробы, содержащей 1-нафтиламин.

Итоговая методика определения 1-нафтиламина в водном растворе следующая. В пластиковую кювету ( $l = 1$  см) наливают 1 мл  $1 \times 10^{-6}$  М раствора люминола в универсальном буфере (рН 3.0) и 1 мл анализируемого раствора (либо воды в случае контрольного опыта). Кювету ставят в спектрофлуориметр, добавляют 1 мл 0.1 М водного раствора АДБА и включают облучение с одновременной регистрацией. Параметры прибора следующие: длины волн возбуждения и испускания – 400 и 490 нм, соответственно, ширина щелей возбуждения и испускания – 5 и 5 нм, соответственно. Регистрируют кинетические кривые для каждой пробы в течение 15 с. В качестве аналитического сигнала используют тангенс угла наклона начального участка кинетической кривой (в первые 5 с реакции).

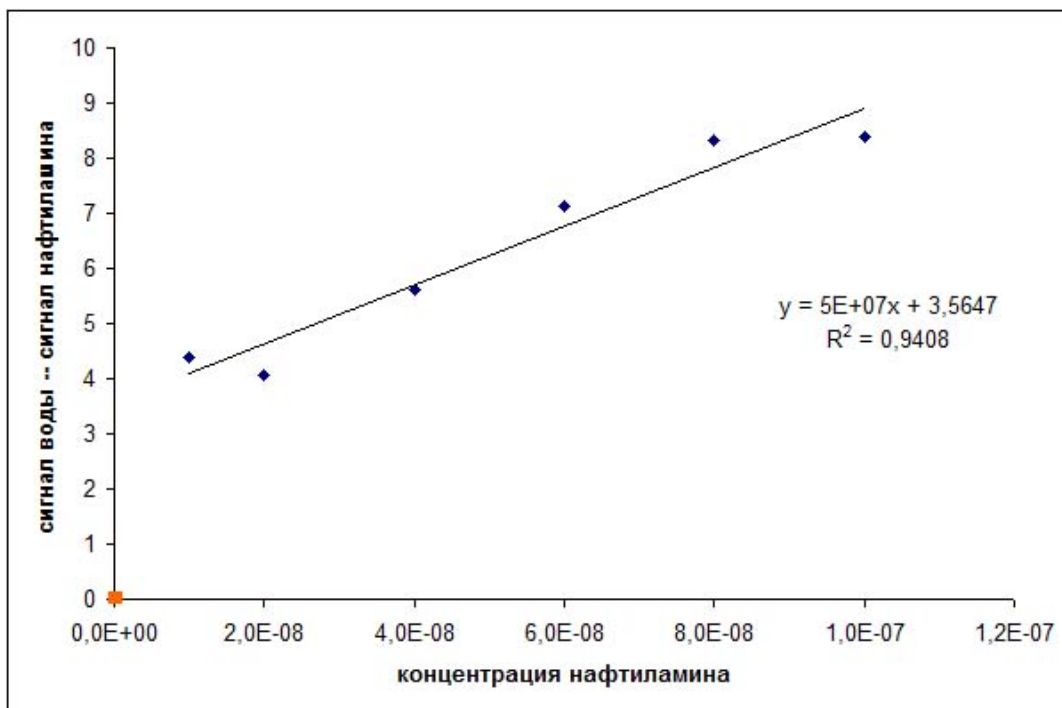


Рисунок 52 – Зависимость разности сигнала контрольной пробы и пробы с 1-нафтиламином от концентрации 1-нафтиламина.

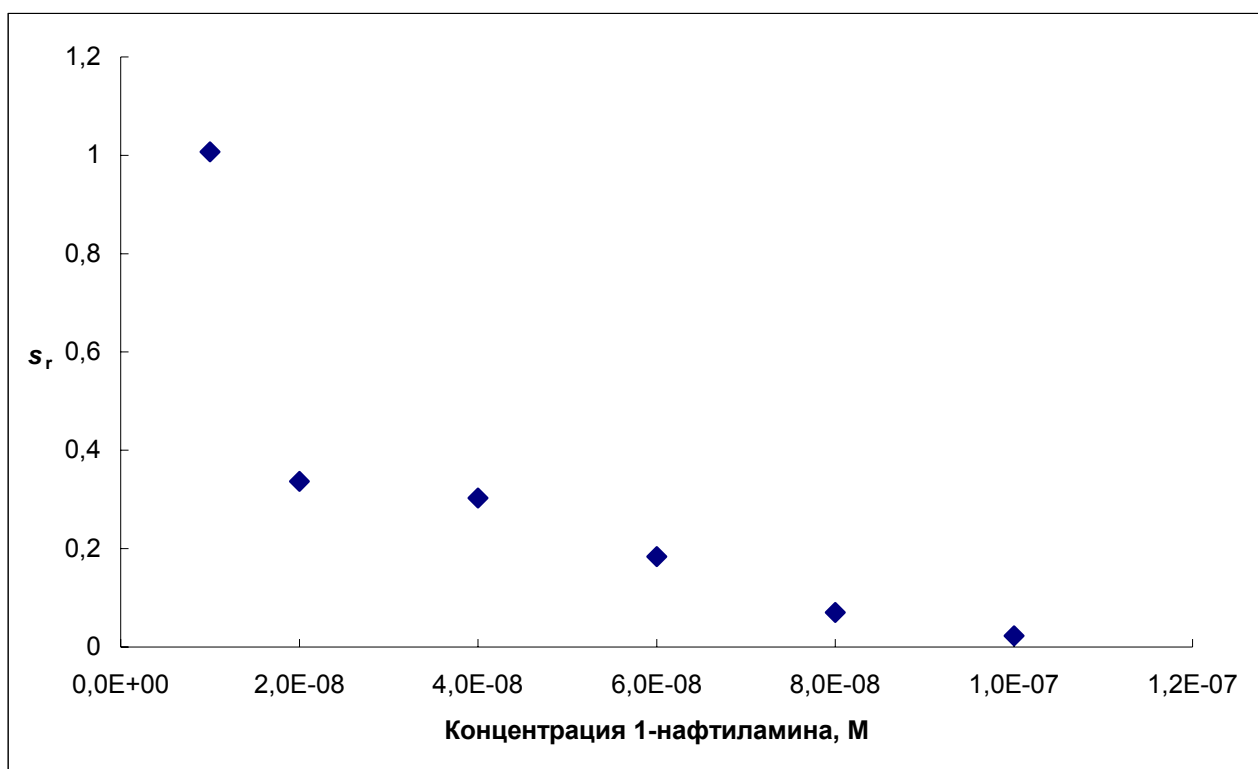


Рисунок 53 – Зависимость стандартного отклонения от концентрации 1-нафтиламина (n=3, P=0.95).

Строят градуировочный график зависимости скорости реакции от концентрации аналита (рис. 52). Метрологические характеристики предложенной методики определения 1-нафтиламина в водном растворе следующие (табл. 18): предел обнаружения, рассчитанный как  $3s_a / b$ , составил  $2,4 \times 10^{-8}$  М. Зависимость стандартного отклонения от концентрации 1-нафтиламина представлена на рис. 53: значение  $s_r$  для  $1 \times 10^{-7}$  М составило 0.02 ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ). Значению 0,3 стандартного отклонения соответствует концентрация 1-нафтиламина  $4 \times 10^{-8}$  М, ее и приняли за нижнюю границу определяемых концентраций.

Таблица 18 – Характеристики методики определения 1-нафтиламина в водном растворе.

a*	$s_a$	b	$s_b$	n	$c_{\min}$ , М**	$c_H$ , М
3.50	0.43	$5.41 \times 10^7$	$6.8 \times 10^6$	17	$2.4 \times 10^{-8}$	$4 \times 10^{-8}$

\* Для уравнения  $y = a + bx$ , где  $x$  – концентрация 1-нафтиламина, М в диапазоне от  $1 \times 10^{-8}$  до  $1 \times 10^{-7}$ ,  $y$  – значение сигнала (тангенс угла наклона кинетической кривой контрольного опыта за вычетом аналогичного значения в присутствии 1-нафтиламина)

\*\*  $c_{\min} = 3s_a/b$

*Анализ сыворотки крови.* В размороженную сыворотку крови человека вводили добавки раствора 1-нафтиламина (конечная концентрация  $1 \cdot 10^{-8}$  –  $1 \cdot 10^{-6}$  М). Для отделения липидов к 1 мл сыворотки крови добавляли 5 мл гексана, встряхивали в течение 5 мин, центрифугировали для разделения слоев, гексановый слой отбрасывали. Затем удаляли белки, для чего к сыворотке добавляли равный объем 0,6 М раствора перхлората лития в ацетонитриле, содержащем 1% уксусной кислоты, центрифугировали и верхний слой вводили в реакцию, как описано выше.

Характеристики полученного таким образом градуировочного графика приведены в табл. 19.

Таблица 19 – Характеристики методики определения 1-нафтиламина в сыворотке крови.

$a^*$	$s_a$	$b^*$	$s_b$	$n$	$c_{\min},$ $M^{**}$	$c_H, M$
4.67	0.62	$4.15 \times 10^7$	$8.3 \times 10^6$	10	$4.5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-7}$

\* См. табл. 18.

В присутствии компонентов крови наклон градуировочной зависимости несколько ниже, чем в водном растворе, а погрешность выше. Предел обнаружения 1-нафтиламина составил по 3s-критерию  $4.5 \cdot 10^{-8}$  М, относительное стандартное отклонение для концентрации 1-нафтиламина  $1 \cdot 10^{-7}$  М оставило 0.25, что позволило принять данную концентрацию за нижнюю границу определяемых концентраций. Для добавки  $5 \cdot 10^{-7}$  М 1-нафтиламина в сыворотке  $s_r = 0.07$  ( $n = 3$ ).

Таким образом, разработана методика определения антибиотика группы пенициллинов (бензилпенициллина) в молоке с пределом обнаружения  $1 \cdot 10^{-7}$  М (*в ТЗ не выше  $1 \cdot 10^{-5}$  М*) и методика определения 1-нафтиламина в сыворотке крови с пределом обнаружения  $4.5 \cdot 10^{-8}$  М (*в ТЗ – не выше  $1 \cdot 10^{-6}$  М*).

### 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. Монографии, опубликованные по результатам выполнения  
государственного контракта.



1. Микрофлюидные системы для химического анализа. Под ред. Ю.А. Золотова и В.Е. Курочкина. М.: Физматлит. 2011. 528 с.

3.2. Статьи, опубликованные по результатам выполнения государственного контракта.

1. Zolotov Yu.A. On some trends. *Talanta*. 2011. Vol. 85. P. 2249-2250.

2. Золотов Ю.А. Аналитическая химия и энергетика. *Журн. аналит. химии*. 2011. Т. 66, № 1. С.3.

3. Золотов Ю.А. Тенденции в аналитическом приборостроении. *Журн. аналит. химии*. 2011. Т. 66, № 2. С. 115.

4. Золотов Ю.А. Успехи хроматографии. *Журн. аналит. химии*. 2011. Т. 66, № 4. С. 339-340.

5. Золотов Ю.А. Об анализе пищевых продуктов. *Журн. аналит. химии*. 2011. Т. 66, № 9. С. 899.

6. N.V. Shvedene, O.A. Avramenko, V.E. Baulin, L.G. Tomilova, I.V. Pletnev. Iodide-Selective Screen-Printed Electrodes Based on Low-Melting Ionic Solids and Metallated Phthalocyanine. *Electroanalysis* 2011, v. 23, N5, 1067-1072.

7. А. Г. Вендило, Д. И. Джигайло, И. В. Плетнев, И. И. Торочешникова. Термодинамика комплексообразования ионов цезия с дибензо-18-краун-6 в гидрофобных ионных жидкостях. *Журн. неорган. химии*, 2011, т. 56, №6, 1010-1016.

8. K. Popov, A. Vendilo, I. Pletnev, M. Lajunen, H. Rönkkömäki and L. H.J. Lajunen. Formation of Complexes in RTIL and Ion Separations. In: *Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches*, 483-510 (Chapter 20). InTechOpen, 2011. ISBN ISBN 978-953-307-349-1.

9. Орешкин В.Н., Цизин Г.И. Атомно-абсорбционный анализ твердых морских и речных взвесей и сорбентов-концентратов. *Океанология*. 2011. Т. 51. № 3. С. 532 – 536.

10. Большов М.А., Карандашев В.К., Цизин Г.И., Золотов Ю.А. Проточные методы определения элементов в растворах, основанные на сорбционном концентрировании и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. *Журн. аналит. химии*. 2011. Т. 66. № 6. С. 564 – 581.

11. Цизин Г.И. Методы концентрирования микрокомпонентов. Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 11. С. 1135 – 1143.
12. В.Н.Орешкин, Г.И. Цизин. Атомно-абсорбционное определение элементов в твердых образцах с применением электротермического атомизатора «тигель с разделенными зонами». // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 10. С. 1069 – 1072.
13. Statkus M.A., Sokhranyaeva A.S., Tsyisin G.I., Zolotov Yu.A. Subcritical water for the desorption of 2-chlorophenol in on-line solid-phase extraction–HPLC analysis. Mendeleev Commun. 2011. V. 21. № 5. P. 270 – 271.
14. А.В. Пирогов, Е.Б. Пашкова, И.А. Федорова, О.А. Шпигун. Сравнение метиленовой селективности для обращенно-фазовой и микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т.11. Вып.2. С.228-235.
15. Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Экспрессное определение ловастатина в плазме крови методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // Зав. лаборатория. 2011. Т.77. №1. С.17-20.
16. K.N. Smirnov, I.A. Dyatchkov, M.V. Telnov, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun. Effect of monomer mixture composition on structure and chromatographic properties of poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene-co-2-hydroxyethylmethacrylate) monolithic rod columns for separation of small molecules. // J.Chromatogr.A. 2011. V.1218. No. 30. P.5010-5019.
17. A.F. Prokhorova, V.A. Larin, A.N. Mikhalyuk, S.M. Staroverov, E.N. Shapovalova, O.A. Shpigun. Enantioseparation of organic acids of pharmaceutical interest using eremomycin as a chiral selector. Electrophoresis. 2011. V.32. P. 2663-2668.
18. Ананьева И.А., Елфимова Я.А., Мажуга А.Г., Рудаковская П.Г., Шаповалова Е.Н., Зык Н.В., Шпигун О.А. Новый наногибридный функциональный материал для ВЭЖХ на основе наночастиц золота, стабилизированных L-цистеином. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. №3. С. 281-290.
19. Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А., Староверов С.М., Кузнецов М.А.. Адсорбция эремومیцина на стенках кварцевого и модифицированных капилляров при электрофоретическом разделении

энантиомеров ароматических кислот.// Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. №5. С.589-599.

20. А.В. Пирогов, И.А. Дьячков, О.А. Шпигун. Синтез, устойчивость и хроматографические свойства силикагелей, модифицированных полиэлектролитными комплексами. // Физикохимия поверхностей. 2011. Т.47. № 6. С. 594-603.

21. I.A. Rodin, A.V. Braun, E.I. Savelieva, I.V. Rybalchenko, I.A. Ananieva, O.A. Shpigun. Rapid method for the detection of metabolite of sulfur mustard 1,1'-sulfonylbis[N-acetylcysteiny]ethane] in plasma and urine by liquid chromatography-negative electrospray-tandem mass spectrometry // Journal of liquid chromatography and related technologies. 2011. 34. P. 1-10.

22. Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Влияние функциональной группы на свойства новых полистирол-дивинилбензольных анионообменников. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т.11. Вып.2. С.235-244.

23. Затираха А.В., Смоленков А.Д., Дьячков И.А., Шпигун О.А. Влияние алкилирующего агента на эффективность и селективность новых полимерных анионообменников. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2. Химия. 2011. Т.52. №5. С.375-381.

24. Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Синтез новых полимерных анионообменников с использованием реакции нитрования. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т.11. Вып.4. С.473-481.

25. N.A. Sitnikova, A.V. Borisova, M.A. Komkova, A.A. Karyakin. Superstable Advanced Hydrogen Peroxide Transducer Based on Transition Metal Hexacyanoferrates. // Anal. Chem. 2011. V. 83. P. 2359 – 2363.

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

1. Андреева Елена Юрьевна «Сорбционное выделение и концентрирование метилксантинов и их определение различными методами». Дата защиты – 26 октября 2011 г. Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия. Диссертационный совет Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.

2. Затираха Александра Валерьевна «Новые полистирол-дивинилбензолные анионообменники с повышенной гидрофильностью для ионной хроматографии». Дата защиты – 26 октября 2011 г. Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия. Диссертационный совет Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.

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

№ п. п.	Фамилия Имя Отчество	Дата рождения	Должность	Ученая степень	Место работы
1	Статкус Михаил Александрович	22.06.1983	снс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
2	Апери Владимир Владимирович	30.04.1986	нс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
3	Родин Игорь Александрович	21.11.1983	нс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
4	Ланская Светлана Юрьевна	14.05.1979	ст. преп.	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
5	Прохорова Александра Федоровна	01.04.1984	мнс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
6	Воронин Олег Геннадьевич	26.06.1982	нс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
7	Кубышев Сергей Сергеевич	26.12.1982	мнс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
8	Буслова Татьяна Сергеевна	02.04.1989	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
9	Мясникова Дина Андреевна	22.05.1989	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
10	Ставрианиди Андрей Николаевич	13.07.1989	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
11	Голубева	11.09.1989	аспи-		Химический факультет

	Александра Владимировна		рант		МГУ им. М.В.Ломоносова
12	Бурмыкин Дмитрий Александрович	12.11.1987	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
13	Самохин Андрей Сергеевич	02.06.1987	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
14	Федюнина Наталья Николаевна	30.10.1988	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
15	Сохраняева Александра Сергеевна	10.07.1988	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
16	Терещенкова Анна Александровна	06.08.1989	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
17	Смирнов Роман Сергеевич	12.11.1986	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
18	Соколова Лидия Сергеевна	19.11.1989	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
19	Затираха Александра Валерьевна	14.05.1986	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
20	Андреева Елена Юрьевна	30.01.1986	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
21	Браун Аркадий Владимирович	06.10.1988	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
22	Борисова Дина Рашидовна	12.01.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
23	Дубенский Александр Сергеевич	31.01.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
24	Назаренко Дмитрий Владимирович	01.11.1991	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
25	Костромских Анастасия Андреевна	26.09.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
26	Архипова Виктория Владиславовна	09.08.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
27	Атнагулов Айдар	30.09.1990	студент		Химический факультет МГУ им.

	Газинурович				М.В.Ломоносова
28	Толмачева Вероника Владимировна	30.06.1991	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
29	Бескоровайный Александр Васильевич	18.07.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
30	Копицын Дмитрий Сергеевич	12.01.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
31	Коваленко Анастасия Андреевна	14.02.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
32	Кагазежева Зухра Галиевна	0.6.08.1989	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

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

Разработаны 4 лабораторных образца (в ТЗ – 4 лабораторных образца) ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения не ниже  $10^{-5}$  М (в ТЗ – не ниже  $10^{-5}$  М), время отклика электродов не более 1 мин (в ТЗ – не более 1 мин), эксплуатационный ресурс – не менее 3-6 месяцев (в ТЗ – не менее 3-6 месяцев).

Разработаны 2 лабораторных образца (в ТЗ – 2 лабораторных образца) биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе биоэлектродокатализа ферментами гидрогеназами, обеспечивающие определение водорода с чувствительностью  $3 \text{ А} \times \text{М}^{-1} \times \text{см}^{-2}$  (в ТЗ – не менее  $\text{А} \times \text{М}^{-1} \times \text{см}^{-2}$ ) и пределом обнаружения  $3 \times 10^{-8}$  М (в ТЗ – не более  $5 \times 10^{-8}$  М).

Разработана методика определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии, обеспечивающая определение целевого компонента при содержании в интервале не выше 5 и не ниже 1000 нг/л (в ТЗ – не выше 5 и не ниже 1000 нг/л) с относительной погрешностью не выше 40 % (в ТЗ – не выше 40 %).

Разработана методика определения антибиотика группы пенициллинов (бензилпенициллина) в молоке с пределом обнаружения  $1 \cdot 10^{-7}$  М (в ТЗ не выше  $1 \cdot 10^{-5}$  М) и методика определения 1-нафтиламина в сыворотке крови с пределом обнаружения  $4.5 \cdot 10^{-8}$  М (в ТЗ – не выше  $1 \cdot 10^{-6}$  М).

### 3.8. Индикаторы и показатели

№	Наименование индикатора	Ед. измер.	Требования ТЗ на 2011 г.	Фактическое выполнение
И.1.1.1	Количество кандидатов наук – исполнителей НИР, представивших докторские диссертации в диссертационный совет (нарастающим итогом)	чел.	2	3
И.1.1.2	Количество аспирантов – исполнителей НИР, представивших кандидатские диссертации в диссертационный совет (нарастающим итогом)	чел.	12	13
И.1.1.3	Количество студентов, аспирантов, докторантов и молодых исследователей закрепленных в сфере науки, образования и высоких технологий (зачисленных в аспирантуру или принятых на работу в учреждения высшего профессионального образования, научные организации, предприятия оборонно-промышленного комплекса, энергетической, авиационно-космической, атомной отраслей и иных приоритетных для Российской Федерации отраслей промышленности) в период выполнения НИР (нарастающим итогом)	чел.	12	14
И.1.1.4	Количество исследователей – исполнителей НИР, результаты работы которых в рамках НИР опубликованы в высокорейтинговых российских и зарубежных журналах	чел.	42	44
И.1.1.5	Наличие документов, подтверждающих внедрение результатов работ в образовательный процесс	ДА/НЕТ	да	да
	<b>Наименование показателя</b>			

П.1.1.1	Количество докторов наук – исполнителей НИР, работающих в научной или образовательной организации на полную ставку, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	8	9
П.1.1.2	Количество молодых кандидатов наук – исполнителей НИР, работающих в научной или образовательной организации на полную ставку, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР (как правило, соискателей ученой степени доктора наук)	чел.	6	7
П.1.1.3	Количество аспирантов, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	12	14
П.1.1.4	Количество студентов, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	10	11
П.1.1.5	Доля привлеченных на реализацию НИР внебюджетных средств от объема средств федерального бюджета	%	20	20
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	58

#### 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 № 3 настоящего проекта разработаны новые способы и устройства (в том числе на основе ионных жидкостей и биосенсоров) для определения физиологически активных органических веществ, их мониторинга; современные методы анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов.

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

Разработанные ионселективные электроды на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот (раздел 2.2), биосенсоры для определения молекулярного водорода на основе биоэлектродокатализа ферментами гидрогеназами (раздел 2.3), методики определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах (раздел 2.6), антибиотика группы пенициллинов (бензилпенициллина) в молоке и 1-нафтиламина в сыворотке крови (раздел 2.7) необходимы ориентировочно в 300 организациях (эколого-аналитических службах, промышленных предприятиях при необходимости контроля сточных вод и др.). Стоимость одной методики – не менее 30 000 руб. Потенциальный экономический эффект – не менее 9 млн. руб.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках работ по этапу № 3 государственного контракта от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365 разработаны разработаны новые способы и устройства (в том

числе на основе ионных жидкостей и биосенсоров) для определения физиологически активных органических веществ, их мониторинга; современные методы анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов: 4 лабораторных образца ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения не ниже  $10^{-5}$  М, время отклика электродов не более 1 мин, эксплуатационный ресурс – не менее 3-6 месяцев; 2 лабораторных образца биосенсоров для определения молекулярного водорода на основе биоэлектродокатализа ферментами гидрогеназами, обеспечивающие определение водорода с чувствительностью  $3 \text{ А} \times \text{М}^{-1} \times \text{см}^{-2}$  и пределом обнаружения  $3 \times 10^{-8}$  М; методика определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии, обеспечивающая определение целевого компонента при содержании в интервале не выше 5 и не ниже 1000 нг/л с относительной погрешностью не выше 40 %; методика определения антибиотика группы пенициллинов (бензилпенициллина) в молоке с пределом обнаружения  $1 \cdot 10^{-7}$  М и методика определения 1-нафтиламина в сыворотке крови с пределом обнаружения  $4.5 \cdot 10^{-8}$  М.

Кроме того, разработаны научно-методические материалы к учебным курсам и программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс.

Все работы выполнены на мировом уровне и в соответствии с требованиями Технического задания к контракту. В рамках выполнения работ по этапу защищено 2 кандидатских диссертации, опубликована монография и 25 статей в высокорейтинговых журналах.

## 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. – No.3. – P. 145 – 155.
3. Демин Е.М. Изучение растворимости ионных жидкостей и возможности их использования в мембранах ИСЭ. Дипломная работа. Москва, Химический факультет МГУ. – 2007.
4. Wilkes J.S., Levisky J.A., Wilson R.A. // *Inorg. Chem.* – 1982. – V.21. – P. 1263 – 1264.
5. Scott M.P., Brazel C.S., Benton M.G. // *Chem. Commun.* – 2002. – P. 1370 – 1371.
6. Shvedene N.V., Chernyshov D.V., Khrenova M.G. // *Electroanalysis* – 2006. – V.18. – No. 13-14. – P.1416 – 1421.
7. Wadhawan J.D., Schroder U., Neudeck A. J. // *Electroanal. Chem.* – 2000. – V. 493. – P. 75 – 83.
8. Nassi A., Ebelle C. // *Electroanalysis.* – 2011. – V.23. – No.2. – P.424 – 432.
9. Fukushima T., Kosaka A., Ishimura Y. // *Science.* – 2003. – V. 300. –No. 5628. – P. 2072 – 2074.
10. Liu T., Zhu X. J. // *Electroanal. Chem.* – 2011. – V.651. – P.216 – 221.
11. Liu H., He P., Li Z. // *Electrochem. Comm.* – 2005. – V. 7. – № 12. – P.1357 – 1363.
12. Maleki N., Safavi A., Tajabadi F. // *Anal. Chem.* – 2006. – V. 78. – P. 3820 – 3826.
13. Safavi A., Maleki N., Moradlou O., Tajabadi F. // *Anal. Biochem.* – 2006. – V. 359. – P. 224 – 229.
14. Safavi A., Maleki N., Tajabadi F. // *Analyst* – 2007. – V. 132. – P. 54 – 58.
15. Li J., Zhao F., Zeng B. // *Microchim. Acta.* – 2007. – V. 157. – № 1-2. – P. 27 – 33.
16. Liu Y., Shi L., Wang M. A novel room temperature ionic liquid sol–gel matrix for amperometric biosensor application // *Green Chem.* – 2005. – No.7. – P.655 – 658.

17. Shvedene N.V., Chernyshev D.V., Gromova Yu.P. Hydrophobic ionic liquids in plasticized membranes of ion-selective electrodes // *Russ. Khim. Zh.* – 2010. – V.65. – No.8. – P.880 – 884.
18. Chernyshov D.V., Egorov V.M., Shvedene N.V. Pletnev I.V. Low-melting ionic solids: versatile for ion-sensing devices // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2009. – V.1. – No.9. – P.2055 – 2059.
19. Березин И.В., Богдановская В.А., Варфоломеев С.Д., Тарасевич М.Р., Ярополов А.И. Биоэлектрокатализ. Равновесный кислородный потенциал в присутствии лактазы. // *Докл. АН СССР.* – 1978. – Т. 240. – № 3. – С. 615 – 617.
20. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakemanc J.B., Walsh F.C. Biofuel cells and their development. // *Biosen. Bioel.* – 2006. – V. 21. – P. 2015 – 2045.
21. Armstrong F.A., Hill H.A.O., Walton N.J. Direct electrochemistry of redox proteins. // *Acc. Chem. Res.* – 1988. – V. 21. – P. 407.
22. Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T., Gazaryan I. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. // *Anal. Chim. Acta.* – 1999. – V. 400. – P. 91 – 108.
23. Ivnitcki D., Atanassov P. Electrochemical Studies of Intramolecular Electron Transfer in Laccase from *Trametes versicolor*. // *Electroanalysis.* – 2007. – V. 19. – P. 2307 – 2313.
24. Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology.* // – 2006. – V. 24. – P. 219 – 226.
25. Shleev S., Kasmi A.E., Ruzgas T., Gorton L. Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode. // *Electrochem. Commun.* – 2004. – V. 6. – P. 934 – 939.
26. Shleev S., Tkac J., Christenson A., Ruzgas T., Yaropolov A.I., Whittaker J.W., Gorton L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – V. 20. – P. 2517 – 2554.
27. Kjeanga E., Djilali N., Sintona D. Microfluidic fuel cells: A review. // *J. Power Sour.* – 2009. – V. 186. – P. 353 – 369.
28. Cooney M.J., Svoboda V., Lau C., Martina G., Minteer S.D. Enzyme catalysed biofuel cells. // *Energy Environ. Sci.* – 2008. – V. 1. – P. 320 – 337.

29. Martinek K., Klyachko N.L., Levashov A.V., Berezin I.V. // Dokl. Akad. Nauk. USSR. – 1983. – V. 263. – P. 491.
30. Martinek K., Pshezhetskii A.V., Merker S., Pepanyan G.S., Klyachko N.L., Levashov A.V. // Biokhimiya. – 1988. – V. 53. – P. 1013.
31. Moore C.M., Akers N.L., Hill A.D., Johnson Z.C., Minter S.D. Improving the Environment for Immobilized Dehydrogenase Enzymes by Modifying Nafion with Tetraalkylammonium Bromides. // Biomacromolecules. – 2004. – V. 5. – P. 1241 – 1247.
32. Frew J.E., Hill H.A.O. Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins. // European J. Biochem. – 1988. – V. 172. P. 261 – 269.
33. Armstrong F.A., Wilson G.S. Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. // Electrochim. Acta. – 2000. – V. 45. – P. 2623 – 2645.
34. Leger C., Jones A.K., Albracht S.P.J., Armstrong F.A. Effect of a dispersion of interfacial electron transfer rates on steady state catalytic electron transport in [NiFe]-hydrogenase and other enzymes. // J. Phys. Chem. – 2002. – V. 106. – No 50. – P. 13058 – 13063.
35. Willner I., Heleg-Shabtai V., Blonder R., Katz E., Tao G., Buckmann A.F., Heller A. Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes. // J. Am. Chem. Soc. – 1996. – V. 118. – P. 10321 – 10322.
36. Gerard M., Chaubey A., Malhotra B.D. Application of conducting polymers to biosensors. // Biosens. Bioelectron. – 2002. – V. 17: – P. 345 – 359.
37. Schuhmann W. Conducting polymer based amperometric enzyme electrodes. // Microchim. Acta. – 1995. – V. 121. – P. 1 – 29.
38. Heller A. Electrical wiring of redox enzymes. // Acc. Chem. Res. – 1990. – V. 23. – P. 128 – 134.
39. Coche-Guerente L., Cosnier S., Labbe P. Sol-Gel Derived Composite Materials for the Construction of Oxidase/Peroxidase Mediatorless Biosensors. // Chem. Mater. – 1997. – V. 9. – P. 1348 – 1352.
40. Koopal C.G.J., Bos A.A.C.M., Nolte R.J.M. Third-generation glucose biosensor incorporated in a conducting printing ink. // Sens. Actuators B. – 1994. – V. 18. – P. 166.
41. Wang G., Thai N.M., Yau S.-T. // Electrochem. Commun. – 2006. – V. 8. – P. 987.

42. Guo L.H., Hill H.A.O. Direct electrochemistry of proteins and enzymes. // *Adv. Inorg. Chem.* – 1991. – V. 36. – P. 341 – 375.
43. Tantillo D., Chen J., Houk K. Theozymes and compuzymes: theoretical models for biological catalysis. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 1998. – V. 2. – No 6. – P. 743 – 750.
44. Willner I. Biomaterials for Sensors, Fuel Cells, and Circuitry. // *Science.* – 2002. – V. 298. – P. 2407 – 2408.
45. Habermuller K., Mosbach M., Schuhmann W.F. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. // *J. Anal. Chem.* – 2000. – V. 366. – P. 560 – 568.
46. Draoui K., Bianco P., Haladjian J., Guerlesquin F., Bruschi M. Electrochemical Investigation of Intermolecular Electron-Transfer Between Two Physiological Partners - Cytochrome-C3 and Immobilized Hydrogenase From *Desulfovibrio-Desulfuricans* Norway. // *J. Electroanal. Chem.* – 1991. – V. 313. – No 1-2. – P. 201 – 214.
47. Butt J.N., Filipiak M., Hagen W.R. Direct electrochemistry of *Megasphaera elsdenii* iron hydrogenase - Definition of the enzyme's catalytic operating potential and quantitation of the catalytic behaviour over a continuous potential range. // *European J. Biochem.* – 1997. – V. 245. – No 1. – P. 116 – 122.
48. Pershad H.R., Duff J.L.C., Heering, H.A., Duin E.C., Albracht S.P.J., Armstrong F.A. Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase: Application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible  $H^+ / H_2$  value. // *Biochem.* – 1999. – V. 38. – No. 28. – P. 8992 – 8999.
49. Bianco P., Haladjian J. Electrocatalytic Hydrogen-Evolution At the Pyrolytic-Graphite Electrode in the Presence of Hydrogenase. // *J. Electrochem. Soc.* – 1992. – V. 139. – No. 9. – P. 2428 – 2432.
50. Volbeda A., Garcia E., Piras C., deLacey A.L., Fernandez V.M., Hatchikian E.C., Frey M., Fontecilla-Camps J.C. Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1996. – V. 118. – No. 51. P. 12989 – 12996.
51. Moreno C., Franco R., Moura I., Legall J., Moura J.J.G. Voltammetric Studies of the Catalytic Electron-Transfer Process Between the *Desulfovibrio-Gigas* Hydrogenase and Small Proteins Isolated From the Same Genus. // *European J. Biochem.* – 1993. – V. 217. – No 3. – P. 981 – 989.

52. Lin Y., Taylor S., Li H., Fernando K.A.S., Qu W.W. L., Gu L., Zhou B., Sun Y.-P. Advances toward bioapplications of carbon nanotubes. // *J. Mater. Chem.* – 2004. – V. 14. – P. 527 – 541.
53. Guiseppi-Elie A., Lei C., Baughman R.H. Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes. // *Nanotechnology.* – 2002. – V. 13. – P. 559.
54. Ivnitski D., Branch B., Atanassov P., Apblett C. Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer. // *Electrochem. Commun.* – 2006. – V. 8. – P. 1204 – 1210.
55. Wang J., Musameh M. // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 539. – P. 209.
56. Rudiger O., Abad J.M., Hatchikian E.C., Fernandez V.M., De Lacey A.L. Oriented Immobilization of *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase onto Carbon Electrodes by Covalent Bonds for Nonmediated Oxidation of H<sub>2</sub>. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – P. 16008 – 16009.
57. ГН 2.1.5.2307-07. Ориентировочные допустимые уровни (ОДУ) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования.
58. Струков В.Ю. Спектроскопическое определение несимметричного диметилгидразина в объектах окружающей среды. Автореф. дисс. ...канд. докт. хим. наук. Краснодар. Кубанский государственный университет. – 2006. – 22 с.
59. Темердашев З.А., Киселева Н.В., Струков В.Ю. // Зав. лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – №3. – С. 3.
60. Темердашев З.А., Киселева Н.В., Струков В.Ю., Коншин В.В. // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2006. – № S10. – С. 33.
61. Методы определения КЖРТ и их производных в объектах производственной и окружающей среды. / Под редакцией Разбитной Л.М. М. – 1988. – С. 338.
62. Евгеньев М.И., Евгеньева И.И., Горюнова С.М., Гармонов С.Ю., Газизуллина Л.Ш. // Журн. аналит. химии. – 1998. – Т. 53. – № 6. – С. 650.
63. Потрохов В.К., Пимкин В.Г. // В сб. Экологические аспекты воздействия компонентов жидких ракетных топлив на окружающую среду. М-лы науч.-практ. конференции 19 – 22 сентября 1995 г. С-Пб.: Изд-во РНЦ «Прикладная химия». – 1996. – С. 41.

64. Атаманюк В.Ю. // Химия и технология воды. – 2002. – Т. 24. – № 4. – С. 384 – 392.
65. Madjumdar T.K., Geno P.W., Yau A. // J. Agric. Food Chem. – 1984. – V. 56. – № 14. – P. 2952.
66. Wright D. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. – 1987. – V. 70. – № 4. – P. 718.
67. Савчук С.А., Бродский Е.С., Формановский А.А. // Журн. аналит. химии. – 1998. – Т.53. – № 7. – С.759.
68. Holtzclaw J.R., Rose S.L., Wyatt J.A. // Anal. Chem. – 1984. – V.56. – № 14. – P. 2952.
69. Садовский А.П., Олькин С.Е. // Химия в интересах устойчивого развития. Новосибирск. – 2001. – Т. 9. – С. 759 – 771.
70. Vatsala S., Bansal V., Tuli D, Rai M. // Chromatographia. – 1994. – V. 38. – P. 456.
71. Preece N.E., Forrow S., Ghatineh S. // J. Chromatogr. Biomed. – 1992. – V. 11. – P. 227.
72. Rutschmann A., Buser R. // J. Agric. Food. Chem. – 1991. – V. 39. – №1. – P. 176.
73. Suzuki T., Nemoto S., Saito Y. // Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi. – 1990. – V. 31. – № 2. – P. 177.
74. Mozayani A., Coutts R., Danielson T. // J.Chromatogr . Biomed. – 1987. – V. 67. – P. 131.
75. Newsome W. H., Kollins P. // Int. J Environ. Anal. Chem. – 1984. – V. 56. – № 14. – P. 155.
76. Сотников Е.Е., Московкин А.С. // Журн. аналит. химии. – 2006. – Т. 61. – № 2. – С.139 – 142.
77. МУК 4.1.1211-03 Газохроматографическое определение несимметричного диметилгидразина в воде. Определение концентраций химических веществ в воде централизованных систем питьевого водоснабжения: Сборник методических указаний. Вып. 3. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. – 2004. – 72 с.
78. Fiala E.S., Kulakis C. // J. Chromatogr. A. 1981. V. 214. P. 229.
79. Smolenkov A., Pirogov A., Shpigun O. // Anal. Sci. – 2001. – V. 17. – P. i769.
80. Abdow H.M., Medwick T., Bailey L.C. // Anal. Chim. Acta. – 1977. – V. 93. – P. 221.



81. Kester P.E., Danielson N.D. // *Chromatographia*. – 1984. – V.18. – №3. – P. 125.
82. Евгеньев М.И., Евгеньева И.И., Исмаилова Р.Н. // *Журн. аналит. химии*. – 2000. – Т. 55. – № 10. – С. 1038.
83. Евгеньев М.И., Евгеньева И.И., Гармонов С.Ю. // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. – 2000. – № 7. – С. 14.
84. Смоленков А.Д., Родин И.А., Шпигун О.А. // *Сорбц. хромат. процессы*. / – 2006. – Т. 6. – № 5. – С. 787.
85. Garcia-Campaña A.M., Baeyens W.R.G. *Chemiluminescence in analytical chemistry*. M. Dekker. – 2001. – 621 pp.
86. Marquette C.A., Blum L.J. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – V. 385. – No 3. – P. 546 – 554.
87. Evmiridis N.P., Vlessidis A.G., Thanasoulis N.C. Chemical Analysis through CL-Detection Assisted by Periodate Oxidation // *Bioinorg. Chem. Appl.* – 2007. – 2007:92595.
88. Hasebe T., Kawashima T. Flow Injection Determination of Ascorbic Acid by Iron(III) Catalyzed Lucigenin Chemiluminescence in a Micellar System // *Anal. Sci.* – 1996. – V. 12. – No 5. – P. 773–777.
89. Hervas C., Ventura S., Silva M., Perez-Bendito D. Computational Neural Networks for Resolving Nonlinear Multicomponent Systems Based on Chemiluminescence Methods // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 1998. – V. 38. – No 6. – P. 1119 – 1124.
90. Li Z., Dai L., Zhang Z. Study on catalytic effect of copper(II) complex on 1,10-phenanthroline-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CTMAB chemiluminescence reaction and its analytical applications.// *Microchem. J.* – 1995. – V. 52. – No 2. – P. 208 – 215.
91. Fritsche U. Chemiluminescence method for the determination of nanogram amounts of highly toxic alkylphosphates // *Analyt. Chim. Acta.* – 1980. – V. 118. – No 1. – P. 179 – 183.
92. Зинчук В.К. Активность алифатических дипероксикислот в хемилюминесцентной реакции люминола // *Журн. аналит. химии*. – 2001. – Т. 56. – № 12. – С. 1274 – 1277.

93. Carr A., Dickson J., Dickson M., Milofsky R. Post-column ultra-fast co-catalyzed peroxyoxalate chemiluminescence detection in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography // *Chromatographia*. – 2002. – V. 55. – No 11/12. – P. 687 – 692.
94. Umeno T., Okamoto Y., Fujiwara T. Determination of amino acids by capillary electrophoresis coupled to copper(II)-catalyzed luminol chemiluminescence detection system // *Bunseki Kagaku*. – 2003. – V. 52. – No 12. – P. 1199 – 1202.
95. Li Z., Li K., Tong S. Study of the Catalytic Effect of Copper(II)-Protein Complexes on Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Chemiluminescence Reaction and its Analytical Application // *Anal. Lett.* – 1999. – V. 32. – No 5. – P. 901 – 913.
96. Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Val O. Flow-injection chemiluminescence determination of citrate based on a photochemical reaction // *Analyst*. – 1995. – V. 120. – No 2. – P. 471 – 475.
97. Sulaiman B., Bashir W.A. Spectrophotometric determination of 1-naphthylamine in aqueous solution by coupling with diazotized 4-aminoacetophenon. // *Analyst*. – 1984. – V. 109. – P. 1409 – 1411.
98. Jorge L., Mar G., Martinez L. L., Pedro L., Albal L., Jesus E., Duran C., Martin V. C. Multisyringe flow injection analysis for determination of 1-naphthylamine in water samples. // *Microchim. Acta*. – 2006. – V. 153. – P. 139 – 144.
99. Кузьмина Е.В., Хатунцева Л.Н., Апяри В.В., Дмитриенко С.Г. Сорбционно-фотометрическое определение 1-нафтиламина с использованием пенополиуретана и тетрафторбората 4-нитрофенилдиазония. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. – 2007. – Т. 48. – № 2. – С. 101 – 105.
100. Roncero R. G., Francisco J., Rueda M. V., Luis M., Diez P., Perez R. Spectrophotometric determination of 1-naphthylamine in urine with pentacyanonitrosylmanganate(II). // *Microchim. Acta*. – 1990. – III. – P. 151 – 158.
101. Mefford I., Keller R. W., Adams R. N. Liquid chromatographic determination of picomole quantities of aromatic amine carcinogens. // *Anal. Chem.* – 1977. – V. 49. – No. 4. – P 683.
102. Qingxiang Zhoua, Xiaoguo Zhanga, Junping Xiao. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase micro-extraction: a novel approach for the sensitive determination of aromatic amines in water samples. // *J. Chromatogr. A*. – 2009. – V.

1216. – P. 4361 – 4365.

103. Yan Zhu, Muhua Wang, Huangyong Du, Fang Wang, Shifen Mou, Haddad P.R. Organic analysis by ion chromatography 1. Determination of aromatic amines and aromatic diisocyanates by cation-exchange chromatography with amperometric detection. // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – V. 956. – P. 215 – 220.

104. Akyuz M., Ata S. Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in water and sediment samples by ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – V. 1129. – P. 88 – 94.

105. Cheing-Tong Yan, Jen-Fon Jen, Tung-Sheng Shih. Application of microwave-assisted desorption/headspace solid-phase microextraction as pretreatment step in the gas chromatographic determination of 1-naphthylamine in silica gel adsorbent. // *Talanta.* – 2007. – V. 71. – P. 1993 – 1997.

106. Jinzhang Gao, Xiaoxia Wei, Wu Yang, Dongyu Lv, Jie Qu, Hua Chen, Hongxia Dai. Determination of 1-naphthylamine by using oscillating chemical reaction. // *J. Hazard. Mater.* – 2007. – V. 144. – P. 67 – 72.

107. Pumera M., Muzikar J., Barek J., Jelinek I. Determination of amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons using capillary electrophoresis. // *Anal. Lett.* – 2001. – V. 34. – No 8. – P. 1369 – 1375.

108. Chen X., Li M. J., Yi C. Q., Tao Y., Wang X. R. Electrochemiluminescence determination of nitro polycyclic-aromatic hydrocarbons using HPLC separation. // *Chromatographia.* – 2003. – V. 58. – No. 9/10. – P. 571 – 577.

109. Guadalupe A. R., Jhaveri S. S., Liu K. E., Abruna. H. D. Electroanalysis of primary amines with chemically modified carbon paste electrodes. // *Anal. Chem.* – 1987. – V. 59. – P. 2436 – 2438.

110. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zimaa J. Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. // *Electroanal.* – 2007. – No 19-20. – P. 2003 – 2014.

111. Ferancova A., Korgova E., Labuda J., Zima J., Barek J. Cyclodextrin modified carbon paste based electrodes as sensors for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic amines. // *Electroanal.* – 2002. – V. 14. – No 23. – P. 1668 – 1673.

112. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. – С. 21.
113. Shivaraman M.S., Lundstram I., Svensson C., Hammarsten H.. Hydrogen sensitivity of palladium-thin-oxide-silicon Schottky barriers. // *Electron. Lett.* – 1976. – V. 12. – P. 483 – 484.
114. Chen H.-I., Chou Y.-I., Chu C.-Y. A novel high-sensitive Pd/InP hydrogen sensor fabricate by electroless plating. // *Sensors and actuators B.* – 2002. – V. 85. – P. 10 – 18.
115. Miremadi B.K., Colbow K. A hydrogen selective gas sensor from highly oriented films of carbon, obtained by fracturing charcoal. // *Sensors and actuators B.* – 1998. – V. 46. – P. 30 – 34.
116. Wang C., Mandelis A., Garcia J.A. Pd/PVDF thin film hydrogen sensor system based on photopyroelectric purely-thermal-wave interference. // *Sensors and Actuators.* – 1999. – V. 60. – P. 228 – 237.
117. Scharnagl K., Karthigeyan A., Burgmair M., Zimmer M., Doll T., Eisele I. Low tempera-ture hydrogen detection at high concentrations: comparison of platinum and iridium. // *Sensors and Actuators.* – 2001. – V. 80. – P. 163 – 168.
118. Nakagawa H., Yamamoto N., Okazaki S., Chinzei T., Asakura S. // *Sensors and actuators B.* – 2003. – V. 93. – P. 468 – 474.
119. Kimura A., Nakatani Y., Yamada K., Suzuki T. Hydrogen detection in CVD diamond films by elastic recoil detection analysis. // *Diamond and Related Materials.* – 1999. – V. 8. P. 37 – 41.
120. Lutz B.J., Fan Z.H., Burgdorf T., Friedrich B. Hydrogen Sensing by Enzyme-Catalyzed Electrochemical Detection. // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77. – P. 4969 – 4975.
121. Ross S.D., Finkelstein M., Petersen R.C. Solvent Effects in the Reactions of N-Bromosuccinimide with Toluene, Fluorene and Acenaphthene; Evidence for a Polar Mechanism in Propylene Carbonate // *J. Am. Chem. Soc.* – 1958. – V. 80. – No 16. – P. 4327 – 4330.

## 7. ПРИЛОЖЕНИЯ

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

**АКТ № 1**  
изготовления 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 4 лабораторных образца ионселективных электродов на основе ионных жидкостей для определения катехоламинов, замещенных фенолов, аминокислот и гидроксикислот, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше  $10^{-5}$  М, время отклика электродов не более 1 мин, эксплуатационный ресурс – не менее 3-6 месяцев.

Ведущий научный сотрудник \_\_\_\_\_ И.В. Плетнев

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

**УТВЕРЖДАЮ**

Зам. декана Химического факультета

МГУ им. М.В.Ломоносова

\_\_\_\_\_ А.В.Анисимов

26 октября 2011 г.

**АКТ № 2**

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

Мы, нижеподписавшиеся, профессор кафедры аналитической химии Карякин  
Аркадий Аркадьевич и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов  
Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. №  
14.740.11.0365 разработаны 2 лабораторных образца биосенсоров для определения  
молекулярного водорода на основе биоэлектрокатализа ферментами  
гидрогеназами, обеспечивающие определение водорода с чувствительностью  $3$   
 $\text{А} \times \text{М}^{-1} \times \text{см}^{-2}$  и пределом обнаружения  $3 \times 10^{-8}$  М.

Профессор кафедры  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ А.А. Карякин

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**  
Зам. декана Химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.В.Анисимов  
26 октября 2011 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 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 разработана методика определения содержания несимметричного диметилгидразина в природных водах методом жидкостной реакционной хроматографии, обеспечивающая определение целевого компонента при содержании в интервале не выше 5 и не ниже 1000 нг/л с относительной погрешностью не выше 40 %.

Ведущий научный сотрудник \_\_\_\_\_ А.Д.Смоленков

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



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

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

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий научный сотрудник Беклемишев Михаил Константинови и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0365 разработана методика определения антибиотика группы пенициллинов в молоке с пределом обнаружения  $1 \cdot 10^{-7}$  М и методика определения 1-нафтиламина в сыворотке крови с пределом обнаружения  $4.5 \cdot 10^{-8}$  М.

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

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