



Agilent Technologies

**МАТЕРИАЛЫ ЛУЧШИХ КУРСОВЫХ РАБОТ
ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ
МОСКОВСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА
Конкурс 2013–2014**

Предисловие

Собранные в этой брошюре материалы представляют собой развёрнутые тезисы курсовых работ по аналитической химии, выполненных студентами II курса химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова в 2012–2013 и 2013–2014 учебных годах и особо отмеченных комиссиями при их защите на кафедре аналитической химии.

Научное редактирование и вёрстка брошюры выполнены д.х.н. проф. М.А. Проскурниным.

ВЫШЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ — БОЛЬШЕ СВОБОДНОГО ВРЕМЕНИ

Новая система ВЭЖХ сверхвысокого давления Agilent 1290 Infinity II

Превосходит ожидания. Устанавливает новые стандарты производительности аналитических исследований, приборов и лаборатории. Получите дополнительное время для выполнения важных задач.

Встречайте новое поколение приборов ВЭЖХ сверхвысокого давления
EfficientUHPLC.agilent.com



На что вы потратите свободное время?
Присоединяйтесь к обсуждению
[#EfficientUHPLC#](https://twitter.com/EfficientUHPLC)

Оглавление

Влияние восстановленного оксида графена на характеристики
твердотельного ионоселективного печатного электрода

Анучин Николай Михайлович _____ 7

Хемилюминесцентное определение пероксида водорода
с использованием каталитического окисления люминола
пероксидом водорода как индикаторной реакции

Копылов Кирилл Евгеньевич _____ 9

Потенциометрическая мультисенсорная система для многокомпонентного анализа

Аксёнова Вера Андреевна _____ 12

Разработка биосенсора для определения лактата в сыворотке крови

Лильина Анастасия Вячеславовна _____ 15

Количественный рентгенофлуоресцентный анализ лекарственного препарата «Де-Нол»

Поликарпова Полина Димитровна _____ 18

Использование НПВО-ИК спектроскопии в количественном
анализе лекарственных препаратов

Шульц Эльвира Викторовна _____ 21

Синтез и исследование ионообменных свойств анионита
IRA-900, модифицированного оксидом церия

Голубенко Даниил Владимирович _____ 23

Молекулярный импринтинг методом поликонденсации
аминокислот в порах трековых мембран

Дивянин Николай Николаевич _____ 26

Изучение комплексообразования *n,n'*-диэтил-*N,N'*-ди(орто-фторфенил)
диамида 2,2'-бипиридил-6,6'-дикарбоновой кислоты с рядом лантанидов

Сударькова Светлана Михайловна _____ 29

Выбор условий определения пероксида водорода с использованием экстрактов
зеленой фасоли, иммобилизованных на кремний–титановых золь–гель материалах

Малютин Алексей Сергеевич _____ 32

Новый анионообменный сорбент для ионной хроматографии на основе
ковалентно модифицированного аминированного силикагеля

Огородников Роман Леонидович _____ 34

Определение сульфаниламидов в водах методом ВЭЖХ после концентрирования на сверхсшитом полистироле, модифицированном магнитными наночастицами	37
Фурлетов Алексей Алексеевич	
Исследование содержания Fe и Au в образцах Fe ₃ O ₄ @Au со структурой «ядро-оболочка»	40
Агафонов Андрей Александрович	
Сорбция стронция-90 и иттрия-90 на сульфате бария, полученном с помощью УЗ-генератора и в водорастворимой матрице сахарозы	42
Твердохлеб Дарья Андреевна	
Экспресс–методика определения цефадроксила для целей биоинженерии пенициллинацилазы из <i>E. Coli</i>	45
Дробот Виктор Валерьевич	
Обнаружение бактериолитических факторов в сыворотке крови карпа (<i>Cyprinus carpio carpio</i>) и их сравнение с яичным куриным лизоцимом по каталитической активности	48
Гасанова Дария Алановна	
Применение ВЭЖХ в анализе культуральных жидкостей почвенных микроорганизмов	51
Кусочек Павел Александрович	
Иммунологическое обнаружение аутоантител против онконеврального антигена рековерина в сыворотке крови как метод ранней диагностики онкологических заболеваний	54
Крячков Вячеслав Александрович	
Использование ВЭЖХ для определения амикумацина а из культуральной жидкости штамма <i>Bacillus pumilus</i>	57
Новолаев Тимофей Игоревич	

Аналитические методы

ВЛИЯНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ОКСИДА ГРАФЕНА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ТВЕРДОТЕЛЬНОГО ИОНОСЕЛЕКТИВНОГО ПЕЧАТНОГО ЭЛЕКТРОДА

АВТОР

Анучин Николай Михайлович

[niko-anuchin@yandex.ru]

РУКОВОДИТЕЛИ

Шведене Н.В.,
Ржевская А.В.,
Капитанова О.О.,
Баранов А.Н.

Кафедра аналитической химии

РЕЗЮМЕ

Проведено нанесение оксида графена на индикаторную поверхность печатного электрода методом химического восстановления и электрохимическим методом. Изучены электрохимические характеристики ИСЭ на бромид-модифицированных ионных жидкостях. Показано, что использование восстановленного оксида графена, полученного различными способами, положительно влияет на работу электродов: по сравнению с не модифицированным графеном электродом. Наблюдается снижение предела обнаружения (с 1.2×10^{-5} до 4.2×10^{-6} М), увеличение линейности электродной функции ИСЭ (с 4 до 5 порядков концентраций) и улучшение воспроизводимости работы ИСЭ.

ВВЕДЕНИЕ

Ионометрия с использованием твердотельных сенсоров является одним из активно развивающихся направлений электроаналитической химии. Потенциометрические сенсоры на основе печатных электродов просты в изготовлении, сравнительно дешевы, миниатюрны и представляют удачную альтернативу многим более сложным и дорогостоящим аналитическим методам.

В качестве электродноактивных компонентов могут быть использованы ионные жидкости (ИЖ) — органические соли, температура плавления которых ниже 100°C . В свою очередь, ИЖ, которые плавятся чуть выше комнатной температуры, называют низкоплавкими ионными материалами. Они обладают комплексом свойств, таких как гидрофобность,

ионная проводимость, ионообменные свойства, необходимых при конструировании ионоселективных электродов (ИСЭ).

Для улучшения характеристик твердотельного ИСЭ, таких как время отклика, воспроизводимость и стабильность потенциала, можно использовать оксид графена (ОГ) в качестве промежуточного слоя между индикаторной поверхностью печатного электрода и слоем электродноактивного вещества. Оксид графена — широкозонный прозрачный полупроводник, хорошо диспергируется в воде, что дает возможность получать равномерные слои ОГ на подложке методом химического восстановления. В свою очередь, восстановленный ОГ (ВОГ) обладает высокой электронной проводимостью, развитой поверхностью и может обеспечивать плавный переход от ионной проводимости в ионочувствительной мембране к электронной проводимости в токоотводе ИСЭ.

Цель работы — использование различных производных оксида графена для улучшения характеристик твердотельного печатного электрода с мембраной на основе ИЖ.

Для нанесения оксида графена и его производных на поверхность электрода использовали метод химического восстановления и метод электрохимического осаждения.

В литературе описан ряд применений оксида графена в различных областях аналитической, в том числе и электроаналитической химии. Однако примеры использования производных ОГ в потенциометрии немногочисленны [1–4] и все посвящены созданию сенсоров на катионы. В работах [1–3] в качестве токоотвода использовали стеклоуглеродный электрод, а в работе [4] — планарный печатный электрод.

Таблица 1. Сравнение характеристик электродов с использованием ОГ и ВОГ

Характеристики электродов	Только ИЖ ($n = 10, P = 0.95$)	ИЖ + ОГ ($n = 5, P = 0.95$)	ИЖ+ЭВОГ ($n = 4, P = 0.95$)	ИЖ + ВОГ ($n=8, P=0.95$)
tga, мВ/дек	-58 ± 1	$-60,5 \pm 1,5$	$-69,6 \pm 0,4$	$-66,9 \pm 0,9$
c_{min} , М	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$4,8 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-6}$
Интервал линейности, М	$10^{-1} - 10^{-4}$	$10^{-1} - 10^{-4}$	$10^{-1} - 10^{-5}$	$10^{-1} - 10^{-5}$
Время отклика, с	15	15	15	15

В потенциометрии существует проблема перехода от ионной к электронной проводимости. Использование ОГ и ВОГ в качестве промежуточного слоя между слоем ионной жидкости и индикаторной поверхностью электрода может решить эту проблему.

Проведены измерения при помощи электродов с использованием в качестве промежуточного слоя оксида графена (ИЖ + ОГ), восстановленного оксида графена (ИЖ + ВОГ) и электрохимически-восстановленного оксида графена (ЭВОГ) (ИЖ + ЭВОГ), а также электрода без промежуточного слоя для сравнения (Только ИЖ). Представлены данные потенциометрических измерений (табл. 1). Из полученных данных видно, что применение ВОГ и ЭВОГ положительным образом влияет на характеристики ионоселективного электрода.



Рис. 1. Схема модифицирования электрода

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Jianfeng Ping, Yixian Wang, J Wu, Yibin Ying // *Electrochemistry Communications* 13 (2011) 1529–1532
- [2] Ewa Jaworska, Wiktor Lewandowski, Jozef Mieczkowski, Krzysztof Maksymiuk, Agata Michalska, // *Talanta* 97 (2012) 414–419
- [3] Rafael Hernandez, Jordi Riu, Johan Bobacka, Cristina Valles, Pablo Jimenez, Ana M. Benito, Wolfgang K. Maser, F. Xavier Rius // *J. Phys. Chem. C*. 2012, 116, 22570–22578.
- [4] Jianfeng P., Yixian W., Yibin Y., Jian W. // *Anal Chem.* 2012 V. 84 P. 3473-9



Рис. 2. Схема перехода от ионной к электронной проводимости в электроде в процессе измерений

Аналитические методы

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛЮМИНОЛА ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА КАК ИНДИКАТОРНОЙ РЕАКЦИИ

АВТОР

Копылов Кирилл Евгеньевич

[kopylov_kirill@hotmail.com]

Руководители

Сахаров И.Ю.,
Демьянова А.С.

Кафедра химической энзимологии

РЕЗЮМЕ

Установлено, что активатор комплекс железа(III) с тетраамидомакроциклическим лигандом (Fe(III)-TAML) является высокоэффективным катализатором реакции окисления люминола пероксидом водорода. При варьировании кислотности реакционной среды, а также концентрации Трис и люминола определены оптимальные условия проведения реакция окисления последнего пероксидом водорода. Предложены условия высокочувствительного хемилюминесцентного определения пероксида водорода по реакции каталитического окисления люминола как индикаторной реакции с пределом обнаружения 1×10^{-7} М. Чувствительность составляет $(2,11 \pm 0,08) \times 10^9$ у.е./М в интервале концентраций пероксида водорода $1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-3}$ М и $(7,8 \pm 0,8) \times 10^8$ у.е./М в интервале концентраций $2,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$ М.

Введение

В настоящее время наблюдается интерес к методам определения пероксида водорода. Это связано с тем, что он имеет очень широкое применение, в частности, в пищевой, фармацевтической, косметической промышленности; используется как окислитель в жидкостных топливных элементах, для дезинфекции воды в бассейнах, продуктов питания и упаковки для напитков. Кроме того, он используется в клинической диагностике как достоверный маркер окислительного стресса, считающегося одним из главных факторов риска при таких заболеваниях, как диабет, атеросклероз, злокачественные опухоли, нефропатии, а

также при старении. Пероксид водорода токсичен для живых организмов, поэтому следует постоянно контролировать его концентрацию в водной среде. Требования практики к методам определения пероксида водорода включают такие позиции, как селективность, высокая чувствительность и быстрота анализа, а также простота, дешевизна и возможность его выполнения в полевых условиях.

Одними из самых высокочувствительных методов определения пероксида водорода являются хемилюминесцентные. При этом в качестве индикаторной реакции используется каталитическая реакция окисления 3-аминофталгидразида (люминола) в 3-аминофталат пероксидом водорода [1]. Данная реакция сопровождается свечением с максимальным сигналом при 425 нм. Наиболее часто применяемым катализатором в данной реакции является пероксидаза хрена [1]. Однако пероксидаза хрена обладает рядом недостатков. Во-первых, это низкая стабильность в условиях реакции. Во-вторых, данный фермент, как и другие биокатализаторы, достаточно дорогостоящий.

В-третьих, к недостаткам фермента следует отнести жесткие требования к условиям катализа (рН, ионная сила, температура), в которых он проявляет активность. Эти факторы ограничивают применимость сенсоров на основе пероксидазы для определения пероксида водорода. Поэтому в настоящее время перспективным является поиск миметиков пероксидазы — небелковых веществ, способных проявлять сходную каталитическую активность.

Наибольшую популярность в качестве миметика пероксидазы имеет гемин [2] (рис. 1а). Недавно [3] синтезирован новый миметик пероксидазы хрена — активатор пероксидов комплекс железа(III) с тетраамидомакроциклическим лигандом (Fe(III)–TAML) (рис. 1б).

Цель работы — разработка нового хемилюминесцентного метода определения пероксида водорода с использованием каталитического окисления люминола пероксидом водорода в присутствии катализатора Fe(III)–TAML как индикаторной реакции.

Для выяснения способности активатора Fe(III)–TAML быть эффективным катализатором реакции окисления люминола пероксидом водорода определена зависимость интенсивности хемилюминесценции, образованной при проведении исследуемой индикаторной реак-

ции в присутствии и отсутствие активатора Fe(III)–TAML, от концентрации H_2O_2 . При выбранных условиях в отсутствие катализатора исследуемая реакция не идет, вне зависимости от концентрации H_2O_2 . При введении активатора Fe(III)–TAML в реакционную смесь наблюдается интенсивная хемилюминесценция при концентрации пероксида водорода выше, чем 1×10^{-5} М, что говорит о том, что эта реакция перспективна для его определения.

Известно, что метрологические характеристики методики зависят от условий проведения индикаторной реакции. В связи с этим, проведена оптимизация условий проведения реакции. В первую очередь, оптимизировали рН реакционной среды. Найдено, что наименьшее значение предела обнаружения достигается при рН 9.9 (табл. 1). При том же значении рН наблюдали и максимальную чувствительность определения. Поэтому в дальнейшем во всех экспериментах использовался буферный раствор с рН 9.9.

На следующем этапе исследовали влияние концентрации Трис в реакционной среде на метрологические характеристики. При варьировании концентрации Трис максимальная чувствительность анализа получена при использо-

Таблица 1. Влияние кислотности реакционной среды на метрологические характеристики хемилюминесцентного метода определения пероксида водорода. Экспериментальные условия: [Fe(III)–TAML] = 10 нМ, [люминол] = 3 мкМ, 20 мМ трис–карбонатные буферные растворы с рН 9,3–10,5 (с доверительной вероятностью $P = 0,95, n = 2$).

рН	9	9,3	9,6	9,9	10,2	10,5
Чувствительность $\times 10^{-9}$ у.е./М	0,31±0,03	0,89±0,08	1,65±0,1	2,61±0,09	2,60±0,04	2,20±0,09
Предел обнаружения $\times 10^8$ М	30	10	8	6	7	8

Таблица 2. Влияние концентрации Трис в реакционной среде на метрологические характеристики хемилюминесцентного метода определения пероксида водорода. Условия эксперимента: [Fe(III)–TAML] = 10 нМ, [люминол] = 3 мкМ, 20 мМ карбонатный буфер, рН 9,9, содержащий различные концентрации Трис (с доверительной вероятностью $P = 0,95, n = 2$).

[Трис], мМ	0	20	50	100	200
Чувствительность $\times 10^{-9}$ у.е./М	1,59±0,07	2,8±0,1	2,6±0,1	2,22±0,09	2,1±0,1
Предел обнаружения $\times 10^8$ М	20	20	10	8	8

Таблица 3. Влияние концентрации люминола в реакционной среде на метрологические характеристики хемилюминесцентного метода определения пероксида водорода. Условия эксперимента: [Fe(III)–TAML] = 10 нМ, [люминол] = 0–81 мкМ, 20 мМ карбонатный буфер, рН 9,9, содержащий 50 мМ Трис (с доверительной вероятностью $P = 0,95, n = 2$).

[люминол], мкМ	0	1	3	9	27	81
Чувствительность $\times 10^{-9}$ у.е./М	н/о	0,08±0,02	1,1±0,4	2,6±0,1	3,4±0,2	3,7±0,2
Предел обнаружения $\times 10^8$ М	н/о	20	5	8	10	50

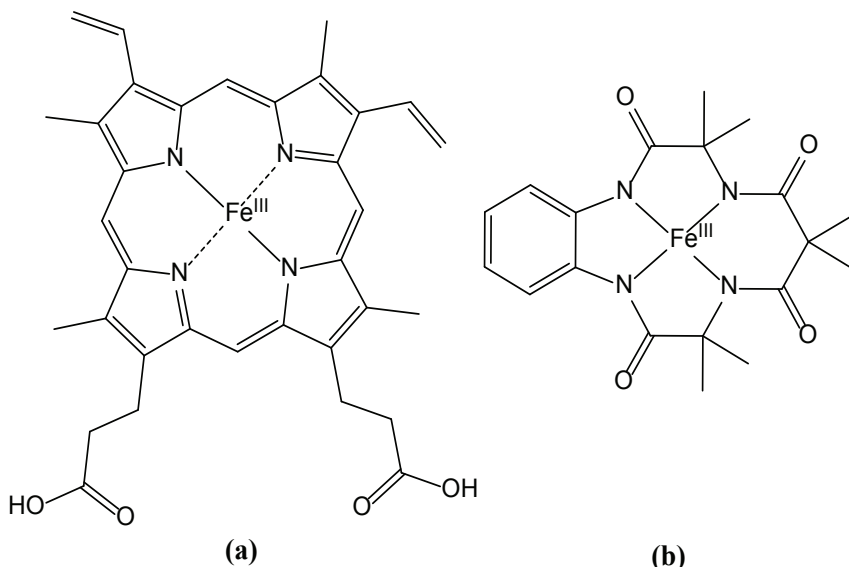


Рис.1. Структурные формулы гемина (а) и активатора Fe(III)-TAML (б)

вании буферных растворов с его содержанием в интервале 20–50 мМ (табл. 2). В то же время, минимальное значение предела обнаружения достигалось при концентрации Трис выше 50 мМ. На основании полученных результатов в качестве оптимальной концентрации Трис выбрано 50 мМ. Далее выполнен поиск оптимальной концентрации люминола. При этом концентрацию люминола в реакционной смеси варьировали в диапазоне 0–81 мкМ. Значения чувствительности и предела обнаружения H_2O_2 представлены в табл. 3. Как и следовало ожидать, в отсутствие люминола люминесценция не наблюдалась. Максимальная чувствительность достигалась при добавлении в реакционную смесь люминола в концентрации 27–81 мкМ. Минимальный предел обнаружения получен при концентрациях люминола 3–27 мкМ. Данные по чувствительности и пределу обнаружения позволили выбрать в качестве оптимальной концентрацию люминола 27 мкМ. Таким образом, в качестве оптимальных выбраны следующие условия: 20 мМ карбонатный буферный раствор, pH 9.9, содержащий 50 мМ Трис, 27 мМ люминола и 10 нМ Fe(III)-TAML. В оптимальных условиях постро-

ена градуировочная кривая (рис. 2). Полученные данные позволили уточнить значение предела обнаружения пероксида водорода $1,0 \times 10^{-7}$ М. Кроме того, в области низких концентраций ($2,0 \times 10^{-5}$ – $1,0 \times 10^{-4}$ М) угол наклона графика отличается от угла наклона в области высоких концентраций ($1,0 \times 10^{-4}$ – $1,0 \times 10^{-3}$ М). Поэтому для указанных концентрационных диапазонов строили две отдельные градуировочные

прямые. Градуировочная прямая для высоких концентраций пероксида водорода ($1,0 \times 10^{-4}$ – $1,0 \times 10^{-3}$ М) описывается уравнением:

$$I_{\text{люм}} = (2,11 \pm 0,08) \times 10^9 \cdot c_{H_2O_2} + (9 \pm 5) \times 10^4, (P = 0,95, n = 5, r = 0,995) \quad (1)$$

Относительное стандартное отклонение 1–5%. Для концентраций пероксида водорода ($2,0 \times 10^{-5}$ – $1,0 \times 10^{-4}$ М) уравнение:

$$I_{\text{люм}} = (7,8 \pm 0,8) \times 10^8 \cdot c_{H_2O_2} + (1,5 \pm 0,5) \times 10^4, (P = 0,95, n = 5, r = 0,995).$$

Относительное стандартное отклонение результатов составляло 2–5%.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Сахаров И.Ю. Использование новых пероксидаз растений в иммуноферментном анализе с хемиллюминесцентной детекцией. Биохимические методы анализа. /Под ред. Б.Б. Дзантиева/, М.:Наука, 2010. С. 349.
- [2] Genfa Z., Dasgupta P.K. // Anal. Chem. 1992. V. 64. P. 517–522.
- [3] Mitchell D.A., Ryabov A.D., Kindu S., Chanda A., Collins T.J. // J. Coordination Chem. 2010. V. 63, N. 14/16. P. 2605–2618.

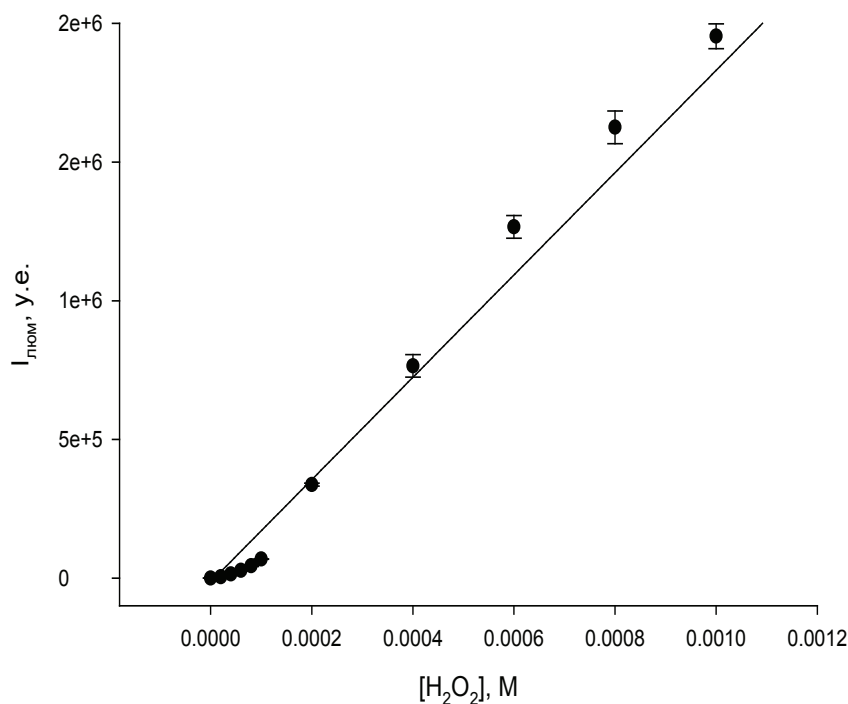


Рис.2. Градуировочная зависимость интенсивности люминесценции от концентрации пероксида водорода, полученная в оптимизированных условиях проведения индикаторной реакции. Условия эксперимента: [Fe(III)-TAML] = 10 нМ, [люминол] = 27 мкМ, 20 мМ карбонатный буфер, pH 9.9, содержащий 50 мМ Трис.

Аналитические методы

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКАЯ МУЛЬТИСЕНСОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО АНАЛИЗА

АВТОР

Аксёнова Вера Андреевна

[aksvera@mail.ru]

РУКОВОДИТЕЛИ

Ржевская А.В.,
Шведене Н.В.

Кафедра аналитической химии

РЕЗЮМЕ

Изучены параметры перекрёстной чувствительности твердотельных ИСЭ и ИСЭ с пластифицированной мембраной на основе ионных жидкостей $\text{DHDIm}^+\text{Cl}^-$, $\text{DHDIm}^+\text{Br}^-$, $\text{DHDIm}^+\text{NO}_3^-$, DHDIm^+I^- . Все электроды, использованные в работе, обладают высокой перекрёстной чувствительностью и могут быть использованы для создания мультисенсорной системы на соответствующие анионы. Показана возможность определения хлорида в двухкомпонентных (Cl^- , NO_3^-) и трёхкомпонентных (Cl^- , NO_3^- , Br^-) смесях. Установлено, что для анализа двухкомпонентных смесей подходят массивы сенсоров, составленные из твердотельных (тт) электродов и электродов с пластифицированной мембраной (пл) на основе $\text{DHDIm}^+\text{Cl}^-$ (тт), $\text{DHDIm}^+\text{NO}_3^-$ (тт), DHDIm^+I^- (тт), $\text{DHDIm}^+\text{NO}_3^-$ (пл), для анализа трёхкомпонентной смеси — на основе $\text{DHDIm}^+\text{NO}_3^-$ (тт), $\text{DHDIm}^+\text{Cl}^-$ (тт), $\text{DHDIm}^+\text{NO}_3^-$ (пл), DHDIm^+I^- (пл). Продемонстрирована возможность определения йодид-иона в четырехкомпонентных системах в присутствии других галогенид-ионов и нитрата. Наименьшая относительная погрешность определения йодид-иона получена для четырёхсенсорных систем, состоящих из комбинаций ИСЭ на основе всех ионных жидкостей, кроме $\text{DHDIm}^+\text{Cl}^-$.

Анализ объектов окружающей среды — одно из главных направлений современной аналитической химии. Важнейшей задачей является разработка точных, экспрессных и недорогих методов контроля состава водных сред. В качестве такого метода может выступать ионометрия с использованием ионоселективных электродов (ИСЭ). Как следует из названия, ИСЭ должны обладать высокой селективностью по отношению к определённому иону. Но большинство электродов недостаточно селективны, чтобы использовать их для определения отдельных ионов в сложной многокомпонентной смеси. Электроды, обладающие групповой чувствительностью к нескольким ионам, могут быть использованы для создания мультисенсорной системы. На отклик такого сенсора оказывают влияние все компоненты смеси, поэтому с помощью подходящих статистических методов обработки данных можно извлечь информацию об активности всех ионов раствора. При выполнении работы использованы электроды с пластифицированной мембраной и твердотельные печатные электроды с использованием в качестве электродноактивных компонентов (ЭАК) ионных жидкостей (ИЖ) на основе катиона 1,3-дигексадецилимидазолия и неорганических анионов (DHDIm^+X^- , где DHDIm^+ 1,3-дигексадецилимидазолий, $\text{X}^- = \text{Cl}^-, \text{NO}_3^-, \text{Br}^-, \text{I}^-$). Потенциометри-

Таблица 1. Значения параметров перекрёстной чувствительности твердотельных электродов (тп) и электродов с пластифицированной мембраной (пл)

ЭАК мембраны	S , мВ/дек	F	K
DHDIm ⁺ Cl ⁻ (тп)	-70,1	10,6	18,1
DHDIm ⁺ Br ⁻ (тп)	-65,7	0,9	24,0
DHDIm ⁺ NO ₃ ⁻ (тп)	-69,3	1,1	51,4
DHDIm ⁺ I ⁻ (тп)	-68,9	1,9	44,3
DHDIm ⁺ Br ⁻ (пл)	-74,8	2,9	20,0
DHDIm ⁺ NO ₃ ⁻ (пл)	-67,0	11,0	24,4
DHDIm ⁺ I ⁻ (пл)	64,3	9,0	50,2

ческие измерения проводились на приборе «Эксперт-001» («Эко-никс–Эксперт», Россия). Отклики, полученные от электродов, обрабатывали посредством многомерного регрессионного анализа с применением метода наименьших квадратов. Для этой цели совместно со студентом Химического факультета МГУ Дроботом В.В. написана программа «RP» на языке C++ с использованием фреймворка Qt.

Цель работы — оценить возможность применения мультисенсорной системы на основе потенциометрических сенсоров, модифицированных ИЖ, для анализа многокомпонентных смесей анионов.

Для электродов на основе ИЖ изучены параметры перекрёстной чувствительности в соответствии с работой [1]: средний наклон электродной функции S , фактор воспроизводимости K и фактор неспецифичности F . Для того чтобы электрод можно было применять в составе мультисенсорной системы, он должен удовлетворять следующим требованиям: $|S| > 50$, $K > 2$ и $F > 0,5$. Все исследованные сенсоры обладают подходящими параметрами перекрёстной чувствительности и могут быть использованы для создания мультисенсорной системы на соответствующие анионы (табл. 1). Показана возможность использования мультисенсорного массива ИСЭ в двухкомпонентной смеси (Cl^- , NO_3^-). Измерения проводили в два этапа: калибровка мультисенсорной системы (измерение отклика электродов в серии калибровочных растворов с чередованием концентраций опреде-

ляемых компонентов) и измерения потенциалов массива ИСЭ в модельных растворах, в которых концентрации компонентов не выходят за границы концентраций калибровочных растворов. Обработку данных проводили для систем, состоящих из двух и более электродов. Аналогичные измерения проводили для трёх- (Cl^- , NO_3^- , Br^-) и четырёхкомпонентных (Cl^- , NO_3^- , Br^- , I^-) смесей. Результаты расчётов концентраций ионов в двух-, трёх- и четырёхкомпонентных смесях представлены в табл. 2, 3 и 4 соответственно. В случае двухкомпонентных смесей относительная погрешность определения хлорид-иона небольшая (табл. 2), однако погрешность определения нитрат-иона высока. При анализе трёхкомпонентных смесей относительные погрешности определения хлорид- и нитрат-ионов небольшие, погрешность определения бромид-иона высока (табл. 3). Следовательно, возможно определение хлорид- и нитрат-ионов в присутствии бромид-иона. В случае четырёхкомпонентных смесей относительная погрешность определения хлорид-, нитрат- и бромид-ионов высока, тогда как погрешность определения йодид-иона сравнительно небольшая (табл. 4). Следовательно, возможно определение йодид-иона в присутствии хлорид-, нитрат- и бромид-ионов. В ходе анализа многокомпонентных смесей показано, что определение составов растворов происходит с некоторой погрешностью. Для уменьшения ошибки определения следует увеличить число электродов, поскольку это повысит точность расчётов за счёт

Таблица 2. Результаты определения содержания хлорид- и нитрат-ионов (М) в двухкомпонентных модельных смесях ($n = 3$; $P = 0,95$)

№	Введено (М)			Найдено		
	$c(\text{Cl}^-)$	$c(\text{NO}_3^-)$	$c(\text{Cl}^-)$, М	δ , %	$c(\text{NO}_3^-)$, М	δ , %
1	$9,0 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-4}$	$(9,2 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	2,4	$(8,79 \pm 0,07) \times 10^{-4}$	9,9
2	$1,0 \times 10^{-2}$	$7,0 \times 10^{-4}$	$(1,01 \pm 0,06) \times 10^{-2}$	0,9	$(8,9 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	26,4
3	$1,1 \times 10^{-2}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$(1,11 \pm 0,07) \times 10^{-2}$	0,8	$(8,2 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	36,5

Таблица 3. Результаты определения хлорид-, нитрат- и бромид-ионов (М) в трёхкомпонентных модельных смесях ($n = 3$; $P = 0,95$)

Введено (М)			Найдено					
$c(\text{Cl}^-)$	$c(\text{NO}_3^-)$	$c(\text{Br}^-)$	$c(\text{Cl}^-), \text{M}$	$\delta, \%$	$c(\text{NO}_3^-), \text{M}$	$\delta, \%$	$c(\text{Br}^-), \text{M}$	$\delta, \%$
$2,0 \times 10^{-3}$	$9,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	1,0	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	27,8	$(4,9 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	145,7
$7,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$(7 \pm 1) \times 10^{-3}$	0,7	$(8 \pm 2) \times 10^{-4}$	19,0	$(5 \pm 5) \times 10^{-4}$	12,2

уменьшения вклада в построение теоретической модели откликов тех электродов, которые неадекватно описывают реальную систему. Также следует увеличить число калибровочных растворов с целью более корректного постро-

ения матрицы откликов и, как следствие, увеличения точности и воспроизводимости определения составов многокомпонентных смесей с помощью мульти-сенсорной системы.

Таблица 4. Результаты определения йодид-иона (М) в четырёхкомпонентных модельных смесях ($n = 3$; $P = 0,95$)

Введено (М)		Найдено	
$c(\text{I}^-)$	$c(\text{I}^-), \text{M}$	$c(\text{I}^-), \text{M}$	$\delta, \%$
$8,0 \times 10^{-5}$	$7,3 \times 10^{-5}$	$7,3 \times 10^{-5}$	9,04
$5,0 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$	4,03

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Legin A.V., Vlasov Yu.G., Rudnitskaya A.M., Bychkov E.A. // Sens. Actuators. 1996. V. B 34. P. 456-461.

Аналитические методы

РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТАТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

АВТОР

Лильина Анастасия Вячеславовна

[A-lilina@mail.ru]

РУКОВОДИТЕЛЬ

Прибыль М.М.

Кафедра аналитической химии

РЕЗЮМЕ

Проведено исследование различных составов мембран для иммобилизации лактатоксидазы на поверхности электродов, модифицированных берлинской лазурью. Показано, что наилучшими данными обладает датчик с 0,3% гамма-аминопропилтриэтоксисилана: диапазон определяемых концентраций 1×10^{-6} – 1×10^{-2} М, чувствительность (59 ± 11) мА/(М×см²). Предварительно опровергнута гипотеза о существовании линейной корреляции между антиоксидантной активностью и концентрацией лактата.

ВВЕДЕНИЕ

Увеличивающийся спрос на быстрые и надежные методы определения метаболических процессов, протекающих в организме, привлекает внимание ученых к проблеме качественного и количественного анализа соединений, способных дать представление о состоянии организма. Определение лактата является одной из важных задач как в клинической диагностике, так и в спортивной медицине. К настоящему времени особое внимание уделяют методам определения лактата, основанным на использовании биосенсоров, так как специфичность иммобилизованного фермента обеспечивает высокую селективность, что позволяет проводить определение интересующего компонента непосредственно в образце, несмотря на сложный состав исходной матрицы. Операционные характеристики электрохимических биосенсоров позволяют применять их для создания датчиков для непрерывного контроля состояния организма. Важной задачей является улучшение аналитических характеристик подобных биосенсоров, также большой интерес представляет исследование зависимости между уровнем лактата и содержанием антиоксидантов в организме для диагностирования за-

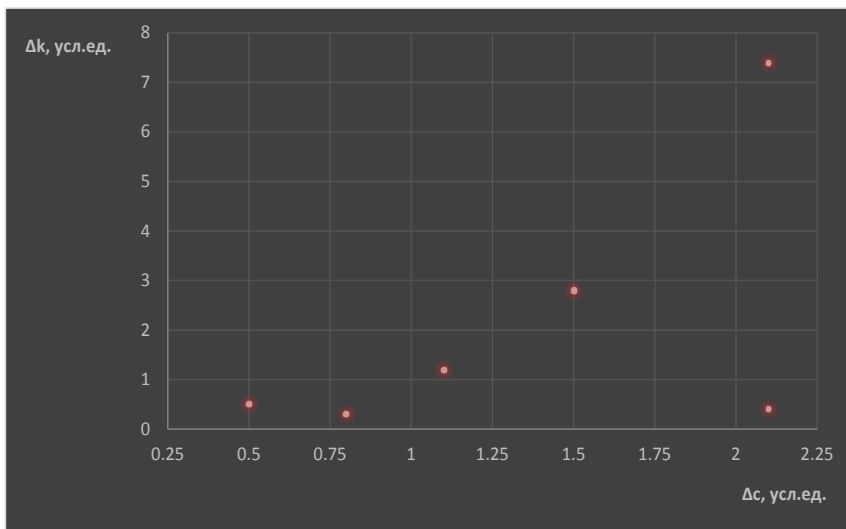


Рис. 1. Корреляционный график, представляющий зависимость между изменением концентрации лактата и изменением константы антиоксидантной активности в сыворотке крови.

болеваний, связанных с обменом веществ.

Цель работы — создание биосенсоров для определения лактата, а также изучение взаимосвязей между содержанием лактата и антиоксидантов в крови.

Проводили амперометрическое определение концентраций лактата в образцах в проточно-инжекционном режиме. При выполнении работы использовали планарные электроды, модифицированные берлинской лазурью, с иммобилизованным на поверхности индикаторного электрода ферментом.

В качестве иммобилизующей матрицы для лактатоксидазы выбран гаммааминопропилтриэтоксисилан, с содержанием в мембране: 0,3, 0,9 и 1,7% для изучения влияния концентрации, а именно плотности мембранообразующего полимера, на аналитические характеристики биосенсоров для определения лактата в

проточно-инжекционном режиме. Сделано предположение, что при увеличении концентрации силоксана в мембране, диффузия субстрата может быть затруднена, что может оказать влияние на аналитические характеристики, а именно: на чувствительность, диапазон определяемых концентраций и время отклика.

Тестирование биосенсоров проводилось в день приготовления и спустя неделю. Аналитические характеристики полученных сенсоров описаны в **табл. 1** и **2**.

Следует отметить, что спустя неделю сенсоры стабильно работают, однако при этом сильно теряют чувствительность и увеличивается их время отклика (**табл. 3**). Также на время отклика влияет концентрация мембранообразующего компонента. При увеличении концентрации силоксана в 3 раза, время отклика датчика в среднем увеличилось на 30%.

Разработанные лактатные био-

сенсоры на основе берлинской лазури и лактатоксидазы, иммобилизованной в силоксановую мембрану, составом 0,3% силоксана, прошли испытания на модельных растворах лактата в оптимизированной системе проточно-инжекционного анализа и на реальных объектах сыворотки крови.

Градуировочная зависимость для электрода, с составом мембраны: 0,3% силоксана описывается уравнением:

$$j = (7,0 \pm 0,3) \times 10^4 c + (0,5 \pm 0,1),$$

($P = 0,95$, $n = 5$, $r = 0,9972$),

где плотность тока (j) выражена в $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, а концентрация (c) лактата — в М.

Образцы сыворотки крови, предоставленные Научно-исследовательским институтом общей реаниматологии имени В.А. Неговского, также проанализированы при помощи биосенсоров с иммобилизованной лактатоксидазой в мембране состава 0,3% гаммааминопропилтриэтоксисилан. Данные по антиоксидантной активности предоставлены сотрудниками лаборатории электрохимических методов. Результаты представлены в **табл. 4**.

Для оценки связи между признаками А и В использовали линейный коэффициент корреляции:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

Согласно расчетам $r_{A,B} = 0,58$.

Полученный результат не позволяет говорить о наличии линейной корреляции, однако, как видно на **рис. 1**, прослеживается тенденция, что большему уве-

Таблица 1. Аналитические характеристики биосенсоров для определения лактата на основе силоксана, протестированы в день иммобилизации фермента ($n = 3$, $P = 0,95$)

Содержание силоксана в мембране, %	Коэффициент чувствительности, $\text{mA}/(\text{M} \times \text{cm}^2)$	Диапазон определяемых концентраций, М
0,3	59 ± 11	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$
0,9	41 ± 6	$1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-3}$
1,7	16 ± 8	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-2}$

Таблица 2. Аналитические характеристики биосенсоров для определения лактата на основе силоксана, протестированы спустя 7 дней после иммобилизации фермента ($n = 3$, $P = 0,95$)

Содержание силоксана в мембране, %	Коэффициент чувствительности, $\text{mA}/(\text{M} \times \text{cm}^2)$	Диапазон определяемых концентраций, М
0,3	4 ± 1	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$
0,9	2 ± 1	

Таблица 3. Время отклика биосенсора (объем пробы 50 мкл, n=3, P=0,95)

Концентрация модельного раствора лактата, М	Среднее время отклика биосенсора, с			
	0,3 % SiI		0,9 % SiI	
	в день иммобилизации	через неделю	в день иммобилизации	через неделю
5×10 ⁻⁵	17 ± 1	23 ± 3	21 ± 1	29 ± 1
1×10 ⁻⁴	20 ± 1	25 ± 1	25 ± 2	36 ± 3
5×10 ⁻⁴	23 ± 1	28 ± 3	26 ± 2	38 ± 2
1×10 ⁻³	25 ± 2	33 ± 3	28 ± 2	59 ± 3

Таблица 4. Результаты определения лактата в образцах сыворотки крови (n = 3, P = 0,95)

Доброволец	Образец пробы крови (i)	Концентрация лактата (с), мМ	$\Delta <c>(c_i/c_{i+1})$, усл.ед. (признак А)	Константа АОА ($k \times 10^3$), с ⁻¹	$\Delta <k>(k_i/k_{i+1})$, усл. ед. (признак В)
1	1	18,4 ± 0,8	1,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1
	2	17,4 ± 0,5	–	2,7 ± 0,2	–
2	3	4,2 ± 0,4	2,1 ± 0,3	19,3 ± 0,3	7,4 ± 0,4
	4	2,0 ± 0,1	–	2,6 ± 0,1	–
3	5	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2
	6	2,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,1
	7	1,4 ± 0,1	–	2,3 ± 0,1	–
4	8	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,3	4,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1
	9	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	10	1,5 ± 0,1	–	5,0 ± 0,3	–

личению содержания лактата в сыворотке крови, соответствует большее увеличение константы антиоксидантной активности.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Yashina E.I., Borisova A.V., Karyakina E.E., Shchegolikhina O.I., Vagin M.Yu, Sakharov D.A., Tonevitsky A.G., Karyakin A.A. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 151–154.
- [2] Phypers B. Pierce T. // Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. 2006. V. 6 (3). P. 135-137.
- [3] Sitnikova N.A., Borisova A.V., Komkova M.A., Karyakin A.A. // Anal. Chem. 2011.V. 83. P. 2359–2363.

Аналитические методы

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «ДЕ-НОЛ»

АВТОР

Поликарпова Полина Димитровна

[polikarpova-polina@rambler.ru]

Руководитель

Моногарова О.В.

Кафедра аналитической химии

РЕЗЮМЕ

Предложен алгоритм расчета теоретической градуировочной зависимости для рентгенофлуоресцентного определения содержания висмута в препарате «Де-Нол». Показано, что предложенный подход позволяет повысить правильность результатов определения висмута без применения образцов сравнения по сравнению с экспериментальным способом градуировочного графика. Адекватность разработанных алгоритмов подтверждена результатами классического титриметрического метода анализа.

Введение

Контроль качества лекарственных препаратов с целью выявления фальсификатов в последнее время является особенно актуальным. Традиционно для анализа фармацевтических препаратов используют методы классического химического анализа, атомно-абсорбционную спектроскопию, методы инфракрасной и масс-спектрологии. Их применение обуславливает необходимость длительной пробоподготовки образца, что, в ряде случаев, неизбежно увеличивает погрешность результатов и время анализа. В настоящей работе показана возможность эффективного применения метода рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) при определении элементного состава порошкового фармацевтического препарата без дополнительной пробоподготовки. Одной из серьезных проблем при РФ-определении висмута в препарате «Де-Нол» (антибактериальное средство, применяемое при лечении гастрита и язвенной болезни желудка) является сложность изготовления адекватных образцов сравнения вследствие сильного влияния формы, фазового состава, структуры и морфологии образца на величину аналитического сигнала и, как следствие, на результаты анализа. Кроме того, процесс изготов-

ления градуировочных образцов длителен, трудоёмок и совсем недешёв. Для решения этой проблемы необходимо выбрать наиболее простой и доступный способ количественного РФА.

Цель работы – определение аналитических возможностей гибридных способов количественного РФА лекарственного препарата «Де-Нол», сочетающих эмпирический и теоретический подходы. Предложенный подход основан на использовании теоретической градуировочной зависимости отношения интенсивности аналитической линии определяемого элемента к интенсивности характеристического излучения рентгеновской трубки (РТ), рассеянного образцом, от его содержания в препарате.

Спектры измеряли с помощью последовательного РФ-спектрометра с волновой дисперсией «СПЕКТРОСКАН МАКС-G» НПО «Спектрон» (Санкт-Петербург). Прибор укомплектован отпаянным газоразрядным пропорциональным счетчиком (газ-наполнитель 90% Хе + 10% СН₄ при атмосферном давлении) и малоэнергичной (4 Вт) острофокусной (*d* 1,5 мм) РТ БХ-7 прострельного типа с тонкопленочным (~2 мкм) Мо-анодом (толщина Ве-окна 200 мкм). Разложение вторичного излучения в волновой спектр осуществляется по методу Иоганссона с помощью кристалла-анализатора LiF(200) (*2d* = 0,4028 нм). Рабочие значения напряжения и силы тока — 40 кВ и 100 мкА соответственно. Угол падения первичного излучения на поверх-

ность образца — 70°, угол отбора вторичного излучения — 30°.

Для определения элементного состава фармацевтического препарата «Де-Нол» измерен его обзорный РФ-спектр в диапазоне длин волн от 310 до 2000 мÅ с шагом 2 мÅ (рис. 1). Время экспозиции 5 с. В исследуемом препарате обнаружен висмут. В качестве образцов сравнения использованы таблетки массой 1,0000 г на основе калиевой соли лимонной кислоты («х.ч.») с содержанием оксида висмута в диапазоне от 0,1000 до 0,5000 г. Гомогенность пробы обеспечивали механическим измельчением порошка в ступке. Для учета возможной неоднородности химического состава аналитический сигнал измеряли 4 раза при повороте на 90°, а полученные значения за вычетом фона усредняли. Для расчёта поправочного коэффициента при построении теоретической градуировочной зависимости измерена интенсивность FeK_α чистого железа. Количественный РФА проводили по BiL_α-линии при длине волны 1145 мÅ. Интенсивность фона измеряли при 1050 и 1240 мÅ. Время экспозиции 60 с. Для подтверждения результатов анализа, полученных с использованием предложенного подхода, применяли метод комплексометрического титрования висмута по стандартной методике [1].

Поскольку степень специфического межэлементного влияния в препарате «Де-Нол» не слишком велика, то для определения содержания висмута можно воспользоваться способом градуиро-

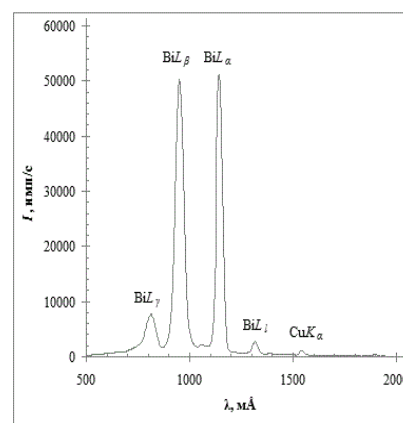


Рис. 1. Обзорный рентгенофлуоресцентный спектр лекарственного препарата «Де-Нол».

вочного графика (табл. 1) [2]. Однако адекватность используемой модели — линейной градуировочной функции — зависит от формы, структуры, морфологии образца. Кроме того, элементный состав исследуемого препарата и образцов сравнения отличается. Такую матрицу назвать инертной уже нельзя, поскольку степень влияния сопутствующих компонентов на аналитический сигнал определяемого элемента различна и может очень сильно зависеть от их содержания. В итоге используемая модель оказывается неадекватной. При попытках решения данной проблемы применен способ «стандарта-фона». В этом случае при нахождении градуировочной зависимости в качестве аналитического сигнала использовано отношение интенсивности выбранной спектральной линии к интенсивности вторичного излучения при длине волны фона в окрестности аналитической линии (табл. 1). Такой аналитический сигнал позволяет нивелировать различие эффективности возбуждения РФ для образцов

Таблица 1. Параметры градуировочных графиков ($m_{\text{табл}} = 1,0000 \text{ г}$). $P = 0,95$, $n = 4$.

Уравнение градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции, r
1* $y = (420 \pm 10)m_{\text{Bi}} + (1800 \pm 100)$	0,982
2* $y = (0,58 \pm 0,05)m_{\text{Bi}} + (1,6 \pm 0,4)$	0,992
3* $y = (0,82 \pm 0,04)m_{\text{Bi}} + (3,3 \pm 0,3)$	0,999

*1 – способ градуировочного графика; 2 – способ «стандарта-фона»; 3 – предложенный подход.

Таблица 2. Результаты определения висмута в препарате «Де-Нол» ($m_{\text{табл}} = 1,0000 \text{ г}$). $P = 0,95$, $n = 4$

Метод	Содержание висмута в таблетке препарата, мг			
	Рентгенофлуоресцентный анализ	Титриметрия	Инструкция к препарату	
Подход	1*	2*	3*	–
<i>m</i> (Bi), мг	105 ± 2	104 ± 2	108 ± 1	106 ± 1

*1 – способ градуировочного графика; 2 – способ «стандарта-фона»; 3 – предложенный подход.

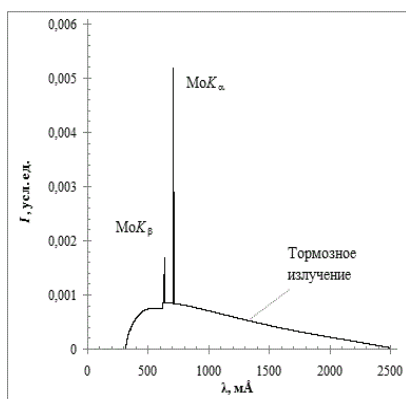


Рис. 2. Рассчитанный спектр излучения рентгеновской трубки трансмиссионного типа с тонкопленочным анодом. Рабочее напряжение 40 кВ.

разного состава и возможные флуктуации интенсивности первичного излучения РТ и в то же время пропорционален содержанию определяемого компонента. Однако при использовании этого способа остаются проблемы, связанные с необходимостью приготовления адекватных образцов сравнения. В связи с этим предложен альтернативный путь решения задачи – гибридный способ количественного РФА. За основу взят эмпирический способ, а вся подготовительная работа выполнена с использованием преимуществ теоретического подхода. Для построения теоретической градуировочной зависимости написана программа, позволяющая моделировать РФА-спектры препарата «Де-Нол», т.е. создан алгоритм решения прямой задачи – нахождение интенсивностей

аналитических линий висмута по заданным концентрациям. Алгоритм решения прямой задачи реализован в программе MS Excel. Убедившись, что различие экспериментальных и теоретических интенсивностей линий висмута для модельных и виртуальных образцов одного состава не превышает нескольких процентов, вычислены интенсивности аналитических линий для 5 виртуальных образцов препарата «Де-Нол», полученных варьированием содержания висмута в диапазоне значений, представляющем практический интерес. Для адекватного расчёта интенсивностей аналитических линий висмута использован алгоритм, включающий в себя вычисление спектра испускания РТ используемого спектрометра (рис. 2), параметров, характеризующих эффективность процессов возбуждения РФ излучением РТ, поглощения характеристического излучения каждого элемента в анализируемом образце, а также размера частиц порошка «средней крупности». Коэффициенты аппаратной чувствительности рассчитаны теоретически с учётом поглощения излучения молекулами воздуха, потери интенсивности при отражении излучения от кристалла-анализатора, эффективности детектирования. Решение уравнения для количественного РФА по-

зволило найти параметры градуировочных уравнений для висмута (табл. 1). Полученные результаты согласуются с указанными в инструкции к препарату содержаниями висмута. Кроме того, их адекватность подтверждена методом комплексонометрического титрования (табл. 2). Таким образом, применение предложенного подхода позволяет повысить правильность результатов определения по сравнению с количественным РФА с применением реальных образцов сравнения. Кроме того, найденная теоретическая зависимость имеет очевидные преимущества: (1) для нахождения вида такой зависимости нет необходимости в использовании образцов сравнения, процесс изготовления которых сложен и достаточно трудоёмок; (2) для выполнения расчётов не нужны дорогие специализированные программы для количественного РФА; (3) все требуемые вычисления легко выполнить с помощью универсального программного пакета MS Excel.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бусев А.И. Аналитическая химия висмута. М.: Издательство академии наук. 1953. 383 с.
- [2] Лосев Н.Ф., Смагунова А.Н. Основы рентгеноспектрального флуоресцентного анализа. М.: Химия, 1982. 208 с.

Аналитические методы

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НПВО-ИК СПЕКТРОСКОПИИ В КОЛИЧЕСТВЕННОМ АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

АВТОР

Шульц Эльвира Викторовна

[shults_elechka@mail.ru]

Руководитель

Проскурнин М.А.

Кафедра аналитической химии

Работа выполнена в партнерской лаборатории Химического факультета МГУ и Компании Agilent Technologies и поддержана грантами РФФИ, 13-03-00535А и 12-03-31569 мол_а.



Agilent Technologies

РЕЗЮМЕ

Предложены условия определения сульфаниламида в смесях с тальком методом внутреннего стандарта (тальк) (волновые числа 3475, 3371 и 3263 см^{-1}). Предел обнаружения сульфаниламида — 5% масс. Предложена экспрессная методика определения метамизола натрия в его водных растворах без пробоподготовки (волновые числа 1159 и 1039 см^{-1}). Предел обнаружения — 3 мг/мл.

ВВЕДЕНИЕ

В аналитической ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием все чаще используют режим нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Он позволяет проводить экспрессный анализ, практически не требует пробоподготовки, предоставляет возможность анализировать сильно поглощающие среды. НПВО-ИК-спектроскопию используют для идентификации фармацевтических препаратов, установления фальсификатов или принадлежности к одной партии и т.п. Существует большое число методик качественного анализа фармацевтических препаратов при помощи НПВО. Однако из-за ряда сложностей регистрации и обработки сигнала количественный анализ при помощи этого метода достаточно затруднен, и работ по методологии и применению НПВО-ИК-спектроскопии для целей аналитического определения достаточно мало.

Цель работы — разработка экспрессных и простых методик определения распространенных фармацевтических веществ, таких как сульфаниламид и метамизол натрия, при помощи НПВО-ИК спектроскопии. Работа проведена на модульном ИК-спектрометре на основе преобразования Фурье Agilent Cary 630 FTIR (Agilent Technologies, США), ко-

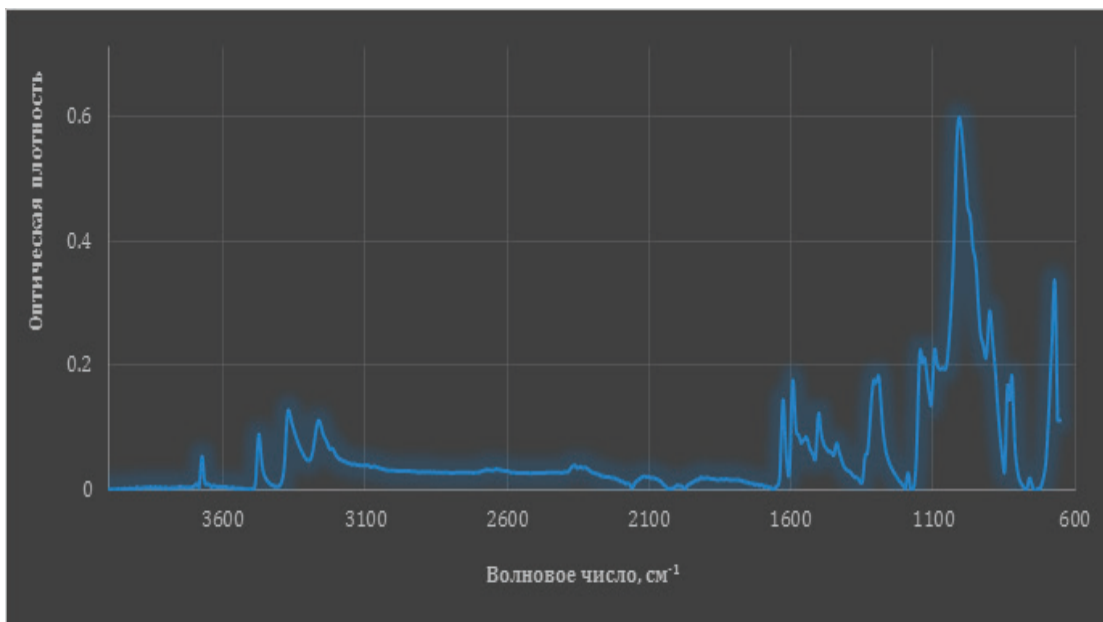


Рис. 1. НПВО-ИК-спектр сухой смеси сульфаниламида и талька с массовой долей стрептоцида 83.3%

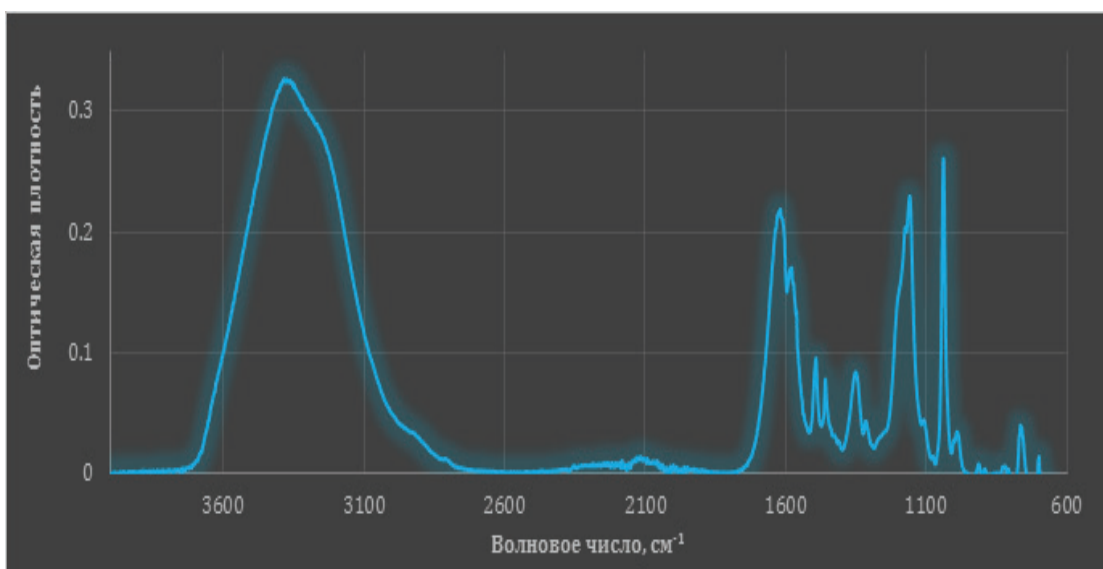


Рис. 2. НПВО-ИК-спектр водного раствора анальгина для внутривенного и внутримышечного введения (содержание метамизола натрия в 2 мл 500 мг/мл)

торый представляет собой спектрометр среднего ИК-диапазона (650 – 4000 см⁻¹) с окнами из ZnSe. Для НПВО-ИК спектроскопических измерений использовали модуль Diamond ATR.

Отнесены основные полосы поглощения в ИК-спектрах сульфаниламида и метамизола натрия, а также ряда веществ как внутренних стандартов и выбраны наиболее интенсивные аналитические полосы. Предложены условия определения сульфаниламида в его смесях с тальком как наполнителем при помощи

НПВО-ИК-спектроскопии (волновые числа 3475, 3371 и 3263 см⁻¹), показано, что для количественных измерений необходимо использовать метода внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта предложен тальк (волновое число 1012 см⁻¹). Предел обнаружения сульфаниламида — 5% масс., диапазон определяемых содержаний 8–100% масс., относительное стандартное отклонение в этом диапазоне не превышает 0.2.

Предложена методика определения метамизола натрия в его

водных растворах без пробоподготовки (волновые числа 1159 и 1039 см⁻¹). Градуировочная зависимость характеризуется хорошей воспроизводимостью, что позволяет использовать предкалибровку прибора. Определение метамизола натрия экспрессно (время анализа 5 мин). Предел обнаружения — 3 мг/мл, диапазон определяемых содержаний 5–500 мг/мл, относительное стандартное отклонение в этом диапазоне не превышает 0.1.

Новые материалы для химического анализа

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИОНООБМЕННЫХ СВОЙСТВ АНИОНИТА IRA-900, МОДИФИЦИРОВАННОГО ОКСИДОМ ЦЕРИЯ

АВТОР

Голубенко Даниил Владимирович

[xрман2009@yandex.ru]

РУКОВОДИТЕЛИ

Прохорова А.Ф.¹,
Караванова Ю.А.²

*1 Кафедра аналитической химии,
2 Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН,
сектор ионного переноса*

РЕЗЮМЕ

Впервые получены гибридные ионообменники на базе коммерческого анионита IRA-900 и оксида церия. Установлено, что модификация солями церия значительно уменьшает статическую обменную емкость анионита. Изучены ионообменные свойства полученных сорбентов. Показано, что при внедрении оксида церия(IV) селективность анионита по отношению к хлорид-иону увеличивается. Показано, что модификация увеличивает сродство ионита к сульфат-иону. Предложено объяснение механизма влияния внедрённых частиц на селективность ионита.

Введение

Последнее десятилетие ознаменовалось бурным ростом количества работ, связанных с получением гибридных композиционных материалов для водоочистки, газоочистки, получения сенсоров и катализаторов [1]. Особенно интересными представляются работы, в которых проводят модификацию ионообменных материалов. Сочетая в себе механическую прочность полимерного ионообменника и уникальные характеристики неорганических допантов (электропроводность, избирательность сорбции), десятки новых ионообменников по селективности и другим характеристикам превосходят свои «негибридные» аналоги. Ранее [2] получен гибридный материал на основе гетерогенной ионообменной мембраны AMEX и оксида церия. Благодаря тому, что относительно других анионов нитрат-ион в нём обладает высокой подвижностью, этот композит предполагается использовать в электродиализной установке

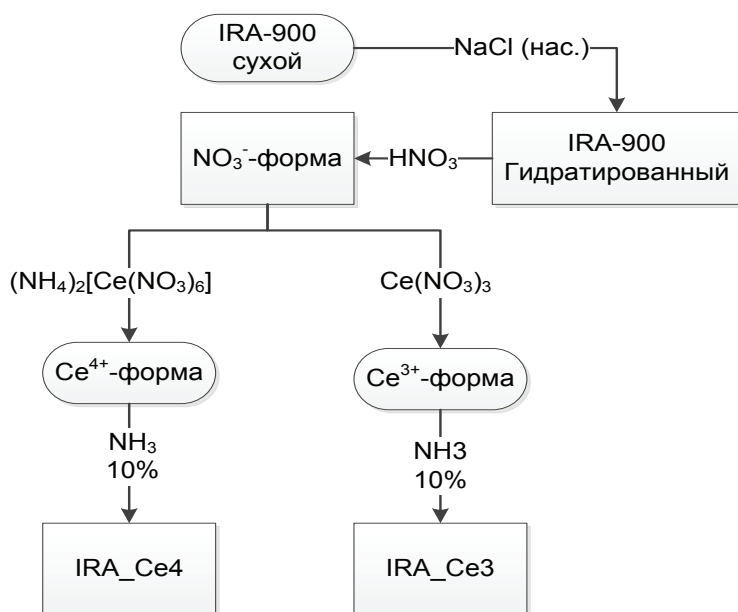


Рис.1. Схема модификации анионита IRA_900

для очистки вод и пищевых концентратов от нитратов. Но, к сожалению, в ходе работы не было изучено влияние модификации на сродство композита к различным анионам.

Цель работы — модификация анионообменного материала оксидом церия, изучение его ионообменных свойств и выявление механизма влияния внедрённых частиц оксида церия на ионообменные характеристики материала.

В работе использовали анионообменную смолу IRA-900 на основе функционализированного триметиламмиониевыми группами сополимера стирола и дивинилбензола (ROHM and HAAS, США). Определение концентрации анионов, ионообменной ёмкости, влагосодержания и модификацию оксидом церия проводили по методикам, описанным в [2–4]. Синтез частиц оксида церия проводили непосредственно в системе пор и каналов ионита (*in situ*). Схема модификации представлена на **рис. 1**.

Выяснено, что модификация приводит к уменьшению влагосодержания и к значительному уменьшению (в 3–4 раза) стационарной ионообменной ёмкости.

Изменение влагосодержания объясняется тем, что частицы оксида церия, образуясь в системе пор и каналов, вытесняют часть внутрипоровую жидкости. С другой стороны, эти частицы могут блокировать значительную долю функциональных групп. Используя представления о строении гибридных ионообменных материалов, эти процессы можно схематично представить следующим образом (**рис. 2**).

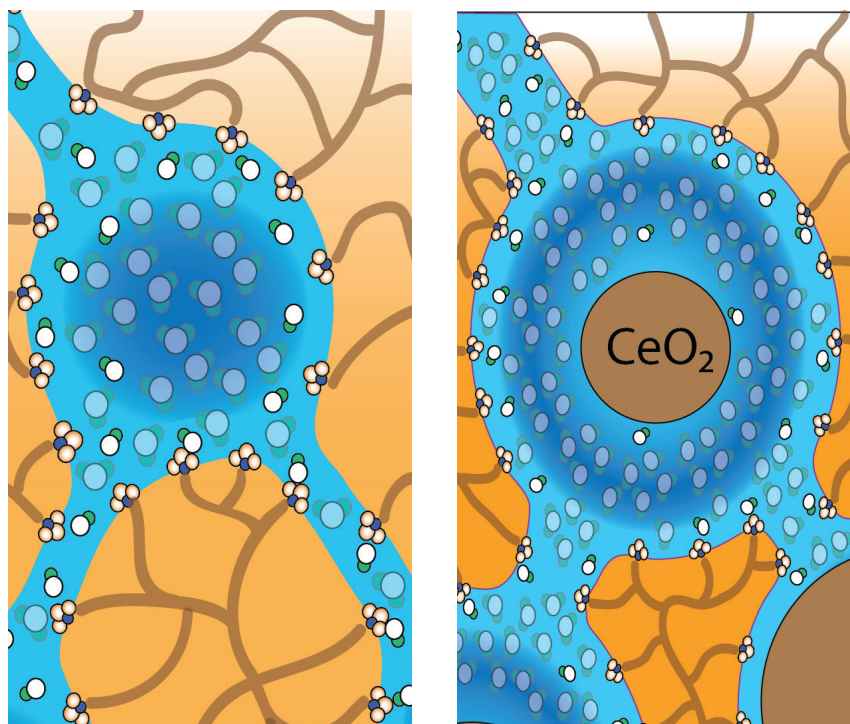


Рис. 2. Строение ионита до и после модификации, в соответствии с моделью Гирке.

Особенно интересным оказалось изменение сродства ионита после модификации. Исходный ионообменник проявляет повышенное сродство к нитрат-иону ($\alpha_{(NO_3^-/Cl^-)} \approx 2$), в то время как модифицированный ионит становится более селективен к хлорид-иону ($\alpha_{(NO_3^-/Cl^-)} \approx 0,4$).

Подобное изменение селективности для однозарядных ионов в классических работах объясняется увеличением давления набухания. Обычно к этому приводит увеличение степени сшивки ионита. Однако в нашем случае частицы оксида церия, выдавливая воду из поры ионита, увеличивают концентрацию функциональных групп, что приводит к возрастанию осмотического давления на ионит — давления набухания. Влияние модификации на сродство к сульфат-иону оказалось более значительным. На **рис. 3** приведены зависимости коэффициента селективности $\alpha(SO_4^{2-}/Cl^-)$ от исходной общей концентрации солей в растворе.

При общей концентрации раствора 80 мг/л коэффициенты селективности для модифицированных

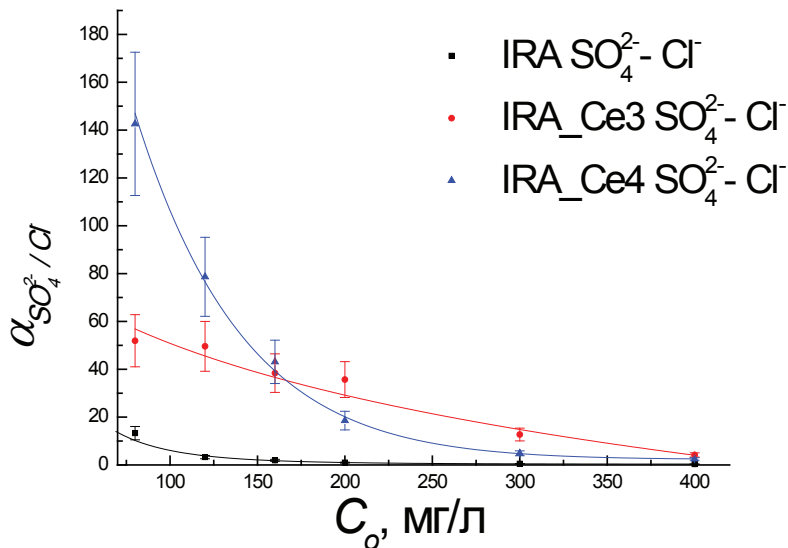


Рис. 3. Зависимость коэффициента селективности $\alpha_{(SO_4^{2-}, Cl^-)}$ от общей концентрации раствора, в котором изначально нитрат и сульфат-ионы находились в равной массовой концентрации.

анионитов IRA_Ce3 и IRA_Ce4 в 4 и 11 раз, соответственно, больше чем для исходного образца. В целом, это, как и в системе Cl^-/NO_3^- , может являться следствием увеличения осмотического давления, оказываемого на ионит, однако существенный вклад в это увеличение может вносить комплексобразование. Комплекс

Ce^{3+} с сульфат-ионом достаточно устойчив ($K(Ce(SO_4)^+) \approx 10^3$) и может образовываться на поверхности наночастицы оксида церия, что приведёт к уменьшению диффузионного слоя наночастицы и, как следствие, уменьшению осмотического давления на ионит. То есть, возможно, частицы оксида церия не только

являются геометрическими телами в системе пор и каналов, но и проявляют себя как участники ионного обмена. Для того что бы выяснить, какой из этих факторов (увеличение степени сшивки и комплексообразование) вносит больший вклад, необходимо получить ионообменник с допантом с тем же объёмным содержанием, но не образующим устойчивые сульфатные комплексы.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] X. Zhao, L. Lv // Chemical Engineering Journal. 2011. V. 170. P. 381.
- [2] Д.В. Голубенко, Ю.А. Караванова, А.Б. Ярославцев. // Изв. АН. Сер. хим. 2013. № 2. С. 391.
- [3] ПНД Ф от 01.01.1999 N 14.1:2:4.157-99. Определение неорганических анионов в воде.
- [4] Н. П. Березина, Н. А. Кононенко, Г. А. Дворкина, Н. В. Шельдешов. Физико-химические свойства ионообменных смол. Краснодар: Изд-во Краснодар. гос. ун-та. 1999. 82 с.

Новые материалы для химического анализа

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМПРИНТИНГ МЕТОДОМ ПОЛИКОНДЕНСАЦИИ АМИНОКИСЛОТ В ПОРАХ ТРЕКОВЫХ МЕМБРАН

АВТОР

Дивянин Николай Николаевич

[nicknick25@mail.ru]

Руководители

Беклемишев М.К.

Кафедра аналитической химии

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-03-00441-а).

РЕЗЮМЕ

Предложен способ получения трековых мембран с молекулярными отпечатками дианиона бромтимолового синего (БТС) карбодиимидной сшивкой аминокислот в присутствии полиэтиленимина на поверхности предварительно окисленной и активированной трековой мембраны. Для мембран, импринтированных с использованием только одной аминокислоты (лейцина), получены отпечатки БТС, связывающие его более прочно, чем в случае смеси аминокислот, что подтверждено результатами изучения диффузии и сорбции БТС. Продолжительность импринтинга существенно влияет на значения импринтинг-факторов. В процессе использования распознающие свойства мембран теряются.

Введение

Один из перспективных методов селективного концентрирования в химическом анализе – молекулярный импринтинг, основанный на самоорганизации и последующей полимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекул-темплатов. Часто молекулярный импринтинг проводят в объеме, получая твердую импринтированную полимерную матрицу. Однако из-за несовершенства структуры сайтов связывания и их неравномерной доступности не удается добиться высокой селективности разделения. Для решения этой проблемы получают тонкие слои молекулярно-импринтированного полимера (МИП) на поверхностях с большой площадью и пористостью, в частности, на поверхности мембран; такие мембраны называются молекулярно-импринтированными (МИМ) [1]. Совмещение свойств

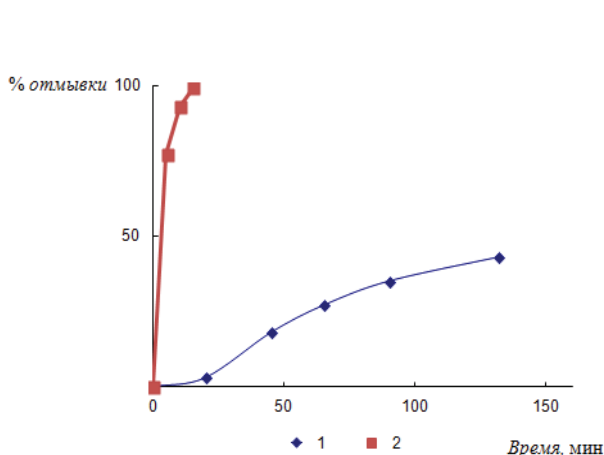


Рис. 1. Отмывка импринтированных мембран от бромтимолового синего: 1 – мембрана на основе лейцина, 2 – мембрана на основе смеси аминокислот.

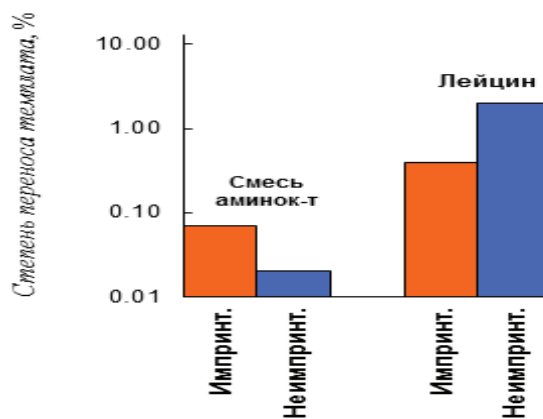


Рис. 2. Степень переноса БТС при его диффузии через импринтированную БТС и неимпринтированную мембраны на основе лейцина и смеси аминокислот.

мембранного транспорта и молекулярного распознавания позволяет получать высокоэффективные мембраны для селективного разделения различных веществ. Кроме того, для повышения качества молекулярных отпечатков перспективно применение нескольких мономеров одновременно, поскольку при этом возможности самоорганизации, по идее, должны раскрываться наиболее полно [2]. В отдельных немногочисленных работах в качестве функциональных мономеров использовали аминокислоты [3]. Получаемые материалы можно рассматривать как аналоги природных антител.

Цель работы — изучить возможность получения молекулярно-импринтированных мембран на основе аминокислот в качестве мономеров.

В задачи работы входило получение МИМ как на основе одной аминокислоты, так и на основе смеси аминокислот методом карбодимидной сшивки в присутствии темплата. Такой способ получения МИМ не найден в литературе, хотя известны отдельные его стадии.

В качестве инертной подложки для получения МИМ использовали трековую мембрану — лавсановую пленку толщиной 10 мкм,

облученную тяжелыми ионами и протравленную щелочью, в результате чего в ней образовались отверстия диаметром 0,4 мкм (мембрана предоставлена ОИЯИ, г. Дубна). Поверхность мембраны предварительно окисляли $KMnO_4$ в кислой среде, чтобы повысить концентрацию поверхностных карбоксильных групп. Для подготовки к иммобилизации аминокислот активировали поверхность пор раствором пентафторфенола (ПФФ) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимидом (ЭДК) в изопропанол, превращая карбоксильные группы в соответствующий малоустойчивый эфир ПФФ. В качестве темплата использовали краситель — бромтимоловый синий (БТС), окраска которого позволяет легко наблюдать его отмывку из мембраны и повторную сорбцию. На основной стадии импринтинга по одну сторону подготовленной мембраны

помещали раствор лейцина или смеси разных аминокислот [3] при pH 6,0, водный раствор ЭДК, полиэтиленимин как структурообразующий компонент и темплата (БТС), а по другую сторону — буферный раствор и проводили диффузию в течение 1–3 сут. Неимпринтированные мембраны получали на основе аналогичных смесей, не содержащих БТС. Для оценки качества полученных молекулярных отпечатков импринтированную и неимпринтированную мембраны отмывали от темплата и проводили серию диффузий (№ 1 и 2) и сорбцию БТС (между диффузиями и сорбцией БТС мембраны также отмывали от БТС). Рассчитывали импринтинг-фактор как отношение степеней переноса БТС (%) через импринтированную и неимпринтированную мембраны (для диффузии) или как отношение степеней сорбции темплата

Импринтинг-факторы для мембран, импринтированных БТС, рассчитанные по результатам изучения сорбции и диффузии БТС

Мономер	Продолжительность импринтинга, ч	Импринтинг-фактор		
		диффузия №1	диффузия №2	сорбция
Лейцин	48	-	-	3,5
	48	0,2	0,5	1,1
	72	0,5	0,7	-
Смесь аминокислот	24	-	-	2,1
	48	0,8	0,9	1,4
	72	4,9	1,2	0,9

через такие мембраны. Значения импринтинг-факторов для различных условий импринтинга представлены в [таблице](#).

Можно отметить довольно высокие значения импринтинг-факторов (3–4) в случае как диффузии, так и сорбции темплата. Оптимизация условий импринтинга в перспективе может значительно повысить эти значения. Свойства полученных мембран существенно зависят от продолжительности импринтинга. Кроме того, свойства молекулярного распознавания, предположительно, теряются в процессе использования мембран, что характеризуется снижением значений импринтинг-фак-

торов с каждой последующей диффузией или сорбцией. Это может быть вызвано контактом мембраны с относительно высокими концентрациями темплата или буфера при диффузионных и сорбционных опытах. Кроме того, отмечена медленная отмывка БТС для мембран на основе лейцина ([рис. 1](#)), что говорит в пользу наличия сайтов прочного связывания темплата. Это подтверждается и характером диффузии раствора БТС через такие мембраны ([рис. 2](#)): импринтированная мембрана на основе лейцина пропускает меньше темплата, чем неимпринтированная. Мембраны на основе смеси

аминокислот проявляют противоположные свойства. Таким образом, мембраны на основе одной аминокислоты (лейцина) более перспективны для прочного связывания темплата в молекулярном импринтинге, чем мембраны на основе смеси аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Piletsky S.A., Turner A.P.F., Landes Bioscience, 2006. P. 80.
- [2] Takeuchi T., Mukawa T., Matsui J., Higashi M., Shimizu K. D. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 3869.
- [3] Giraudi G., Giovannoli C., Tozzi C. // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 481. P. 41.

Новые материалы для химического анализа

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ N,N'-ДИЭТИЛ-N,N'-ДИ(ОРТО-ФТОРФЕНИЛ)ДИАМИДА 2,2'-БИПИРИДИЛ-6,6'-ДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ С РЯДОМ ЛАНТАНИДОВ

АВТОР

Сударькова Светлана Михайловна

[sudarkova.sveta@gmail.com]

Руководители

Коротков Л.А.,
Ерошкина Е.А.

*Кафедра органической химии,
Лаборатория физико-химических
методов анализа строения
вещества.*

РЕЗЮМЕ

Изучено комплексообразование N,N'-диэтил-N,N'-ди(о-фторфенил)диамида 2,2'-бипиридил-6,6'-дикарбонической кислоты с рядом лантанидов в ацетонитриле: обнаружено, что исследуемый лиганд образует комплексы с лантанидами со стехиометрией M:L 1:1. Методом спектрофотометрического титрования определены константы равновесия реакций комплексообразования: диапазон логарифмов констант составляет 5,1–5,9. Показано, что для данного лиганда не характерна зависимость константы равновесия реакции комплексообразования от ионного радиуса комплексообразователя (лантанида). Изучено влияние акцепторного заместителя в орто-положении фенильного кольца анилида на комплексообразование: обнаружено снижение устойчивости комплексов при введении заместителя.

ВВЕДЕНИЕ

Задача выделения и разделения актинилов и лантанидов является довольно актуальной, прежде всего — в атомной промышленности. Эта проблема может быть разрешена путем экстракции, поэтому в настоящее время во многих лабораториях мира ведутся работы по синтезу и исследованию полидентатных лигандов, образующих устойчивые комплексы с f-элементами и обладающих достаточной селективностью к минорным актинидам. Ранее в лаборатории синтезирована серия амидов 2,2'-бипиридил-6,6'-дикарбонической кислоты, показавших большое сродство к ионам РЗЭ и актинилов. Полученные ранее результаты

также показали заметное влияние заместителей в фенильном кольце амидного фрагмента лиганда на степень связывания в комплексы f-элементов.

Цель работы — изучение комплексообразования N,N'-диэтил-N,N'-ди(орто-фторфенил)диамида 2,2'-бипиридил-6,6'-дикарбоновой кислоты (L) (рис. 1) с рядом лантанидов.

Работа выполнена на сканирующем спектрофотометре Olis HPDA 8452, оснащённом двухшприцевым автоматическим титратором. На рис. 2 представлены графики зависимости оптической плотности от длины волны для свободного лиганда и комплексов с лантанидами в абсолютированном ацетонитриле. Наличие максимума поглощения в районе 320–330 нм свидетельствует о комплексообразовании. В данной области собственное поглощение лиганда незначительно, что позволяет использовать методы спектрофотометрического титрования для определения констант равновесия реакций комплексообразования.

Аналитические длины волн вы-

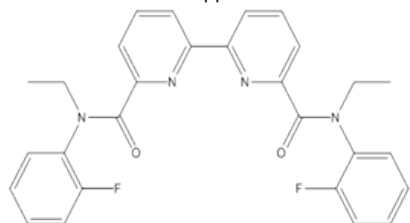


Рис. 1. Структура лиганда N,N'-диэтил-N,N'-ди(орто-фторфенил)диамида 2,2'-бипиридил-6,6'-дикарбоновой кислоты (L), для которого изучалось комплексообразование с рядом лантанидов

бирались с помощью метода Фирордта. В таблице 1 для каждого комплекса лиганда с лантанидами представлены оптимальные аналитические длины волн и рассчитанные молярные коэф-

Таблица 1. Значения аналитических длин волн и молярных коэффициентов поглощения для комплексов лиганда с рядом лантанидов (Ln), полученные в MeCN при 25°C

Ln	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
$\lambda_{ан}$, нм	324	324	320	320	320	324	324	322	322	324	326	324	324	324
$\epsilon \times 10^{-4}$, $M^{-1} \times cm^{-1}$	3,1	2,5	1,7	1,8	1,4	2,3	2,9	1,1	2,2	1,1	3,3	1,0	1,0	3,4

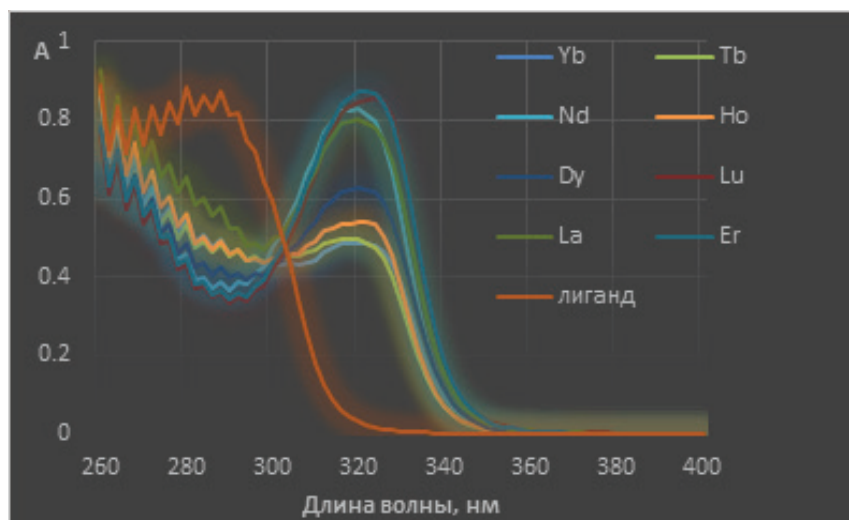


Рис. 2. Спектральные изменения, соответствующие комплексообразованию ионов лантанидов (Ln3+) с N,N'-диэтил-N,N'-ди(орто-фторфенил)диамидом 2,2'-бипиридил-6,6'-дикарбоновой кислоты в ацетонитриле при 25°C

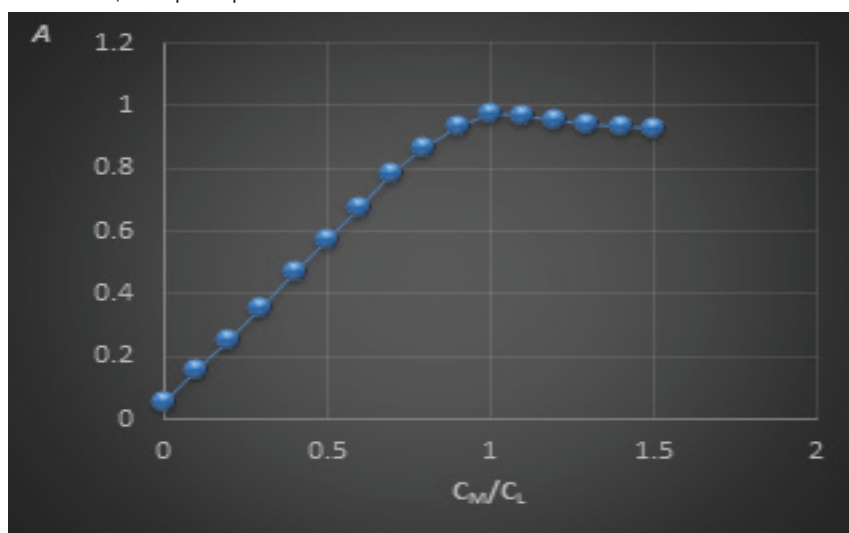


Рис. 3. Кривая спектрофотометрического титрования $5,4 \times 10^{-5} M$ лиганда раствором $1,6 \times 10^{-4} M$ $Pr(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ в MeCN. Перегиб графика соответствует стехиометрии комплекса M:L 1:1

фициенты поглощения. Диапазон аналитических длин волн для комплексов лиганда с лантанидами составил лан 320–326 нм. С помощью титриметрического метода определена стехиометрия каждого комплекса лиганда с рядом лантанидов. Пример кривой спектрофотометрического титрования приведен на рис. 3. В результате все полученные комплексы лиганда с лантанидами имеют стехиометрию M : L = 1 : 1.

Также по результатам проведенного спектрофотометрического титрования рассчитаны константы равновесия реакций комплексообразования (табл. 2). Анализ полученных значений позволяет сделать вывод об отсутствии к а к о й - л и б о

Таблица 2. Величины констант устойчивости комплексов лантанидов с исследуемым амидом

Ln	$lg\beta \pm \delta$
La ³⁺	5,8±0,2
Ce ³⁺	5,5±0,2
Pr ³⁺	5,1±0,2
Nd ³⁺	5,5±0,2
Sm ³⁺	5,3±0,2
Eu ³⁺	5,8±0,2
Gd ³⁺	5,1±0,2
Tb ³⁺	5,4±0,2
Dy ³⁺	5,9±0,2
Ho ³⁺	5,6±0,2
Er ³⁺	5,2±0,2
Tm ³⁺	5,2±0,2
Yb ³⁺	5,4±0,2
Lu ³⁺	5,2±0,2

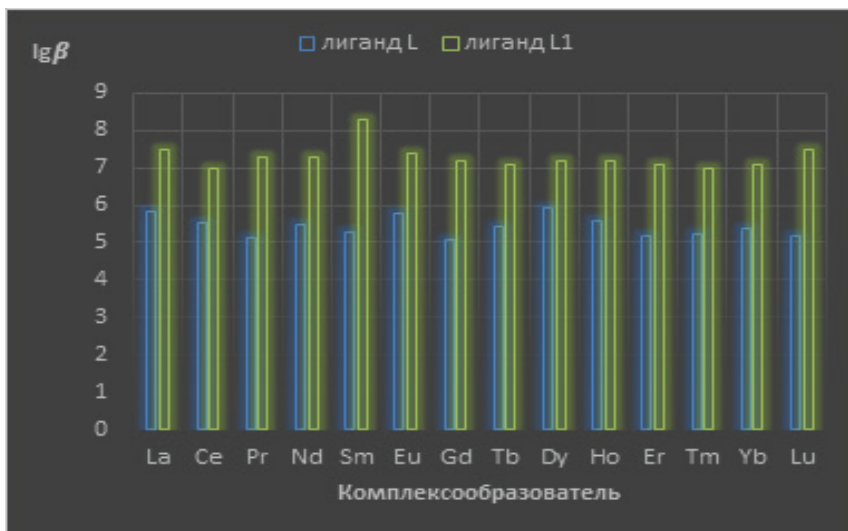


Рис. 4. Зависимость логарифма константы равновесия реакции комплексообразования от лантанида для замещенного в фенильном кольце (L) и незамещенного (L1) лиганда

зависимости устойчивости комплексов от ионного радиуса лантанида. Известно, что на устойчивость комплексов лантанидов с лигандами бипиридинового ряда значительное влияние могут оказывать заместители в амидном и

пиридиновом фрагментах. Сравнение с константами равновесия реакций комплексообразования для лиганда N,N'-диэтил-N,N'-дифенилдиамида 2,2'-бипиридил-6,6'-дикарбоновой кислоты (L1) (различие — в отсутствие атомов фтора в фенильном коль-

це) показывает, что введение сильной электроакцепторной группы в орто-положение фенильного кольца приводит к понижению устойчивости комплексов: $lg\beta$ уменьшаются в среднем на 2 единицы, и находятся в диапазоне 5,1–5,9 (рис. 4).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Mincher B.J., Modolo G., Mezyk S.P. // *Solvent Extr. Ion Exch.* 2009. V. 27. P. 579–606.
- [2] Kolarik Z., Müllich U., Gassner F. // *Solvent Extr. Ion Exch.* 1999. V. 17. P. 23–32.
- [3] Le Borgne T., Bénech J. // *Dalton Trans.* 2003. V. 14. P. 3856–3868.
- [4] Lapka J.L., Paulenova A., Herbst S.R., Law J.D. // *Separation Science and Technology.* 2010. V. 45. P. 1706–1710.
- [5] Babain V.A.; Alyapyshev M.Yu., Smirnov I.V., Shadrin, A.Yu. // *Radiochemistry.* 2008. V. 48. P. 369–373.

Новая система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II представляет новое поколение приборов УВЭЖХ и сочетает исключительную надежность, свойственную компании Agilent, с передовыми технологиями, обеспечивающими максимальную производительность анализа по трем **направлениям**:

МАКСИМАЛЬНОЕ ПОВЫШЕНИЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ПРИБОРОВ

Увеличенная вместимость автосамплера и высокая скорость анализа в сочетании с удобством в эксплуатации обеспечивают высокую производительность в независимости от области применения.



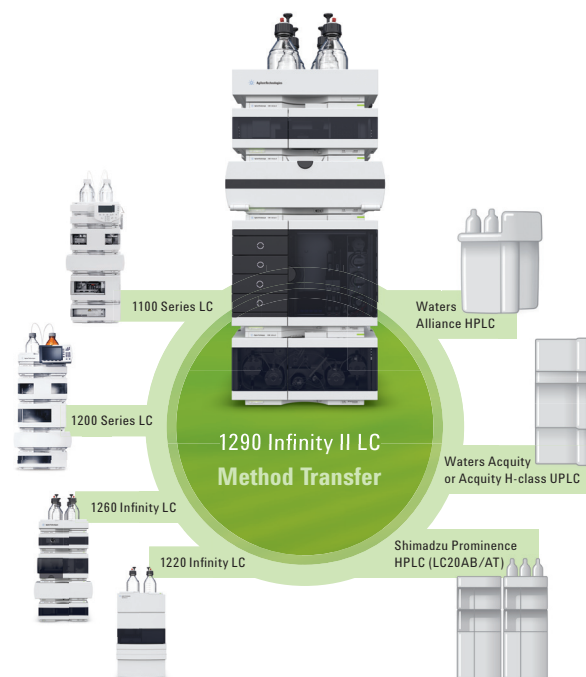
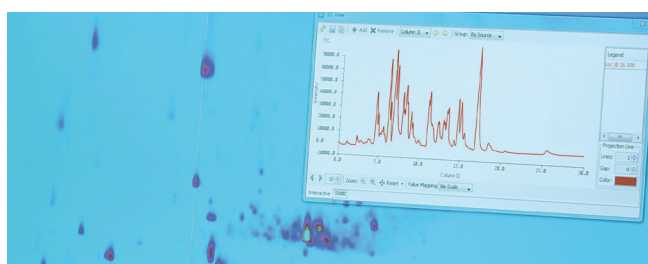
МАКСИМАЛЬНОЕ ПОВЫШЕНИЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРИИ

Благодаря возможности интеграции в лаборатории любого типа и переносу методик, переход к высокой производительности осуществляется без сбоев в работе и при минимальных экономических затратах.



МАКСИМАЛЬНОЕ ПОВЫШЕНИЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Непревзойденные параметры разделения и детектирования позволяют получать данные высокого качества и абсолютную уверенность в результатах.



Интеллектуальная система эмуляции методик ISET позволяет использовать традиционные методики со всеми преимуществами УВЭЖХ - скоростью, разрешением и чувствительностью ВЭЖХ 1290 Infinity II.



This information is subject to change without notice.
 © Agilent Technologies, Inc. 2014
 Printed in U.S.A., November 10, 2014
 5991-5315RURU

Новые материалы для химического анализа

ВЫБОР УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТОВ ЗЕЛЕННОЙ ФАСОЛИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА КРЕМНИЙ–ТИТАНОВЫХ ЗОЛЬ–ГЕЛЬ МАТЕРИАЛАХ

АВТОР

Малютин Алексей Сергеевич

[alex-kl@yandex.ru]

Руководители

Моросанова М.А.,
Моросанова Е.И.

кафедра аналитической химии

РЕЗЮМЕ

С использованием глутарового альдегида разработана методика иммобилизации экстракта зелёной фасоли на кремний–титановых золь–гель материалах. Увеличение пористости кремний–титановых ксерогелей приводит к увеличению активности. Иммобилизованный экстракт зелёной фасоли сохраняет свою активность в течение 37 дней. С использованием модифицированного экстрактом зелёной фасоли кремний–титанового ксерогеля выбраны условия твердофазно-спектрофотометрического определения пероксида водорода. Диапазон определяемых содержаний (90–440) мкМ при объеме пробы 1 мл, время анализа 20 мин.

Введение

В последнее время неинвазивные методы диагностики все чаще используют для диагностики состояния организма. Весьма информативным является определение в моче различных соединений, например, пероксида водорода. К настоящему времени в экспериментальной медицине установлены корреляции между наличием и тяжестью протекания воспаления внутренних органов различной этиологии с концентрацией пероксида водорода в моче. Его концентрация в норме — на уровне 10 мкМ, но при патологических состояниях повышается в десятки и сотни раз.

Цель работы — разработка сенсорных материалов для быстрого экспрессного определения пероксида водорода — предполагала выбор условий иммобилизации экстракта зелёной фасоли в качестве источника фермента на кремний–титановых золь–гель материалах, исследо-

вание изменения ферментативной активности препаратов при хранении и выбор условий для твердофазно-спектрофотометрического определения пероксида водорода с использованием новых материалов.

Неочищенные экстракты различных растений весьма перспективны в качестве источников различных ферментов благодаря значительно большей стабильности по сравнению с очищенными препаратами и существенно меньшей стоимости [1–3]. Литературные данные [4] и ранее проведенные эксперименты показывают, что экстракт зеленой фасоли удобно использовать в качестве источника пероксидазы.

Приготовлен экстракт зеленой фасоли (*Phaseolus vulgaris*) по ранее разработанной методике, включающий измельчение растительного сырья, извлечение ферментов механическим способом в фосфатный буферный раствор при pH 7,0 и отделение экстракта от растительного сырья. Активность полученного экстракта определяли по скорости реакции ферментативного окисления пероксида водорода в присутствии 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, измеряя оптическую плотность порошков от времени. Как и в предыдущих экспериментах 1 ед определяли как 0.01 А/мин при $c_{H_2O_2} = 1.76 \times 10^{-4}$ М:

Носитель	Объем пор, см ³ /г	Активность, ед/г
Si	0.024	0
Si-Ti (1)	0.034	1.15
Si-Ti (2)	0.077	5.75

Согласно полученным данным лучшим материалом оказался кремний–титановый ксерогель с максимальной пористостью. Этот материал использован в дальнейших экспериментах.

Стабильность экстрактов в иммобилизованном и нативном состоянии исследована при хранении при +4°C. Активность измеряли через определённые промежутки времени и сравнивали ее с исходной активностью. Более чем за месяц хранения (37 дней) активность закреплённого экстракта практически не изменилась, в

то время как за сутки хранения нативный экстракт теряет около четверти активности.

С использованием нового сенсорного материала разработана методика твердофазно-спектрофотометрического определения пероксида водорода. С использованием метода фиксированного времени диапазон определяемых содержаний составил (90–440) мкМ, объем пробы 1 мл, время анализа 20 мин. Полученные данные являются основой для разработки тест-систем для определения пероксида водорода в моче на основе использования кремний-титановых ксерогелей, модифицированных экстрактом зеленой фасоли.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Vieira I.C. // *Analyst*. 1998. V. 123. P. 1809.
- [2] Lin M. S., Tham S. Y., Rechnitz G. A. // *Electroanalysis*. 1990. V. 2. P. 511.
- [3] Mazoori J. L., Amjadi M., Orooji M. // *Analyt. Sci.* 2006. V. 22. N 9. P. 1201.
- [4] Fernandes S.C., Zwirter de Oliveira I.R., Vieira I.C. // *Enz. Microb. Tech.* 2007. V. 40. N. 5. P. 661.
- [5] Morosanova E.I. // *Talanta*. 2012. V. 102. P. 114.

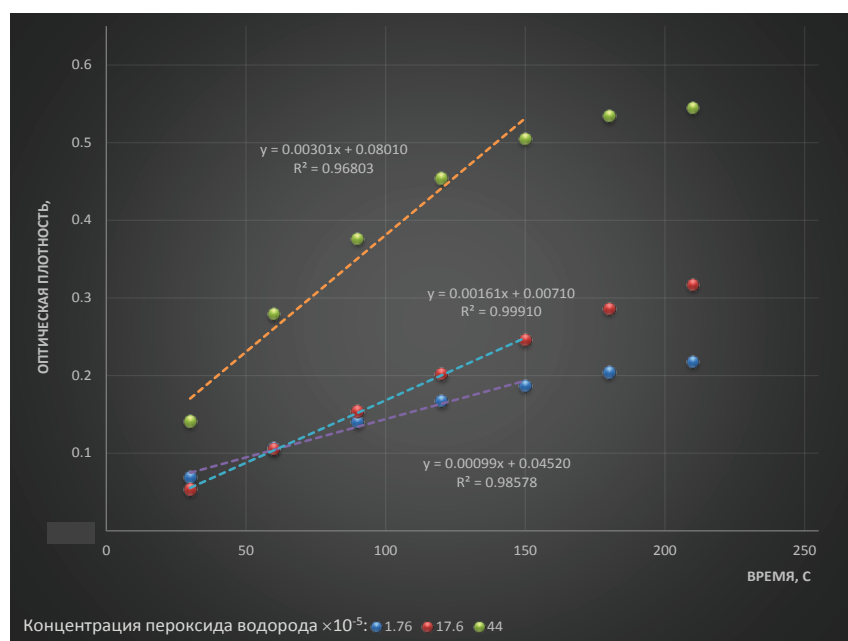


Рис. 1. Линейные участки кинетических кривых взаимодействия пероксида водорода с ТМБ в присутствии экстракта стручков зеленой фасоли.

Новые материалы для химического анализа

НОВЫЙ АНИОНООБМЕННЫЙ СОРБЕНТ ДЛЯ ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ОСНОВЕ КОВАЛЕНТНО МОДИФИЦИРОВАННОГО АМИНИРОВАННОГО СИЛИКАГЕЛЯ

АВТОР

Огородников Роман Леонидович

[Ogroman@mail.ru]

Руководители

Затираха А.В.,
Лошин А.А.

Кафедра аналитической химии

Работа выполнена в партнерской лаборатории Химического факультета МГУ и Компании Agilent Technologies



Agilent Technologies

РЕЗЮМЕ

Предложен новый подход, пригодный для получения анионообменников, который заключается в ковалентном закреплении полимера на поверхности аминированного силикагеля с помощью 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира. По предложенной схеме синтезирован новый анионообменник для ионной хроматографии на основе аминированного силикагеля с ковалентно привитым полиэтиленимином. В одноклоночном варианте ионной хроматографии с УФ-детектированием изучены хроматографические свойства исходного аминированного силикагеля, промежуточного продукта алкилирования и нового анионообменника. Показано, что сорбент, модифицированный полиэтиленимином, характеризуется наилучшей эффективностью и селективностью, и позволяет разделить 11 анионов с эффективностью до 50000 тт/м. Исследован механизм удерживания анионов на новом анионообменнике при использовании в качестве подвижных фаз толуолсульфоновой кислоты с рН 6 и ГФК с рН 6. Установлено, что основным механизмом удерживания является ионный обмен. Показано, что новый анионообменный сорбент с ковалентно привитым полиэтиленимином характеризуется высокой стабильностью и по сроку эксплуатации значительно превосходит полиэлектролитные анионообменники.

Ионная хроматография является одним из лучших аналитических методов определения органических и неорганических ионов. Эффективность и селективность разделения во многом зависит от выбранной неподвижной фазы, свойства которой в свою очередь зависят от природы матрицы, функциональной группы и способа её закрепления.

Существуют два метода закрепления ионообменных групп на поверхности матрицы — ковалентное и электростатическое. Последний вариант используют при получении так называемых полиэлектролитных анионообменников, имеющих отличительные достоинства, такие как высокая эффективность и селективность. Однако полиэлектролитные сорбенты имеют свои недостатки — это существенное уменьшение времен удерживания, эффективности и селективности в процессе эксплуатации. Кроме того, наблюдается резкий рост обратного давления колонки. Решением проблемы могло бы стать ковалентное закрепление функционального полимерного слоя на поверхности силикагеля.

Цель работы — разработка нового сорбента на основе силикагеля с ковалентно привитым полимером, который бы по эффективности и селективности не уступал бы полиэлектролитным сорбентам и обладал улучшенными эксплуатационными характеристиками. Для обеспечения возможности ковалентного закрепления, полимер-модификатор должен содержать в составе первичные, вторичные или третичные аминогруппы, поэтому в качестве аминополимера выбран разветвленный полиэтиленмин (**ПЭИ**). Наиболее удобным способом ковалентной прививки аминокосоединений является их закрепление через диглицидиловые эфиры, которые отличаются хорошей

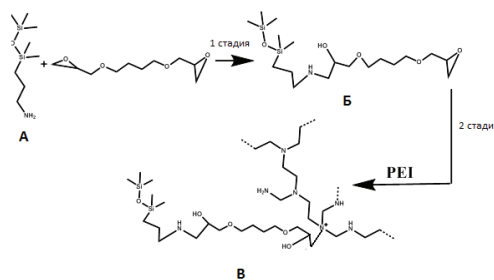


Рис. 1. Схема синтеза анионообменного сорбента с ковалентно привитым полиэтиленмином.

реакционной способностью в реакциях с аминами, что также позволяет обеспечить хорошую воспроизводимость синтеза и пространственно удалить анионообменный слой от активной поверхности силикагеля. Для реализации предложенного подхода оптимальной матрицей является аминированный силикагель. Изучено 3 типа сорбентов: сорбент А — коммерчески приобретенный аминированный силикагель, сорбент Б — получен алкилированием сорбента А диглицидиловым эфиром, сорбент В — получен из сорбента Б модифицированием полиэтиленмином. Этот полимер содержит аминогруппы различной степени замещения, что делает его подходящим модификатором для реализации предложенной схемы (рис. 1).

Поскольку аминированный силикагель (сорбент А), а также про-

Таблица 1. Анионообменная емкость колонок с сорбентами А, Б и В. Размер колонки 50x4 мм

Сорбент	Емкость, ммоль/ колонка
Сорбент А	0,162
Сорбент Б	0,142
Сорбент В	0,335

дукт 1-й стадии (сорбент Б) также содержат аминогруппы, т.е. обладают слабыми ионообменными свойствами и могут служить для разделения анионов, изучены хроматографические свойства сорбентов А и Б и сравнены со свойствами сорбента В. Это подтвердило протекание реакции и факт закрепления полимера на поверхности.

Изучение хроматографических свойств сорбентов проведено в варианте ионной хроматографии с косвенным спектрофотометрическим детектированием. В данной работе в качестве элюента использована хорошо растворимая однозамещенная калиевая соль фталевой кислоты. Исходя из данных табл. 1, емкость сорбента В превышает емкость сорбентов А и Б примерно в два раза, поэтому для адекватного сравнения их хроматографических свойств, в частности, селективности, в качестве элюента для сорбентов А и Б использован водный раствор

Таблица 2. Факторы удерживания и эффективности анионов на колонках с сорбентами А, Б и В. Элюент ГФК, pH 6, F = 1,5 мл/мин.

Определяемый анион	Сорбент А Элюент 2.5 мМ ГФК		Сорбент Б Элюент 2.5 мМ ГФК		Сорбент В Элюент 5 мМ ГФК	
	k'	N (пт/м)	k'	N (пт/м)	k'	N (пт/м)
$C_2H_5COO^-$	1.6	22200	1.8	24700	2.1	29400
CH_3COO^-	1.7	20300	1.8	22100	2.2	30100
IO_4^-	1.6	19900	1.3	21100	2.7	30700
$HCOO^-$	1.8	21600	2.0	21400	2.7	35300
BrO_3^-	1.5	25300	1.7	32200	3.0	43000
Cl^-	1.7	15600	2.1	16700	3.9	32400
NO_2^-	2.1	19300	2.9	24400	4.9	42300
Br^-	1.8	25800	2.8	33000	5.8	53500
NO_3^-	2.3	26200	3.7	33700	6.8	54000
I^-	2.4	33400	5.6	49800	12.2	61000
SCN^-	3.1	33800	9.3	43400	17.5	59600
ClO_4^-	2.9	33300	9.2	39600	19.1	61500
SO_4^{2-}	36.5	34600	23.0	31800	63.7	49300

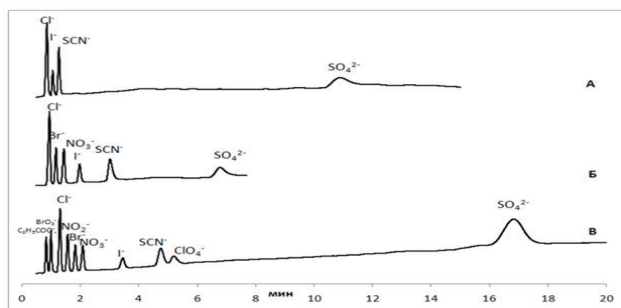


Рис. 2. Хроматограммы смесей анионов на сорбентах А, Б и В. УФ-детектирование, $\lambda=294$ нм. Элюенты: А, Б — 2,5 мМ ГФК, В — 5 мМ ГФК, рН 6. $F = 1,5$ мл/мин.

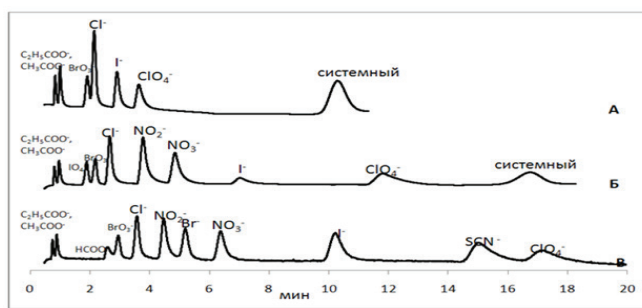


Рис. 3. Хроматограммы смесей анионов на сорбентах А, Б и В. УФ-детектирование, $\lambda=294$ нм. Элюенты: А, Б — 2,5 мМ ГФК, В — 5 мМ ГФК, рН 4,3. $F = 1,5$ мл/мин.

2,5 мМ ГФК, а для сорбента В — 5 мМ ГФК.

Для определения механизма удерживания анионов на синтезированном сорбенте были изучены зависимости логарифма факторов удерживания некоторых анионов от логарифма концентрации элюента. Установлено, что основным механизмом удерживания является ионный обмен. Пропускание 10 л элюента через колонку с сорбентом В не привело к увеличению времен удерживания анионов и росту обратного давления колонки. Анализируя хроматограммы смесей органических и неорганических анионов (рис. 2 и 3) и данные по эффективности и селективности разделения (рис. 4 и 5) сделан вывод, что сорбент с ковалентно привитым полимером (сорбент В) отличается наилучшей разделяющей способностью в ряду А—В, а

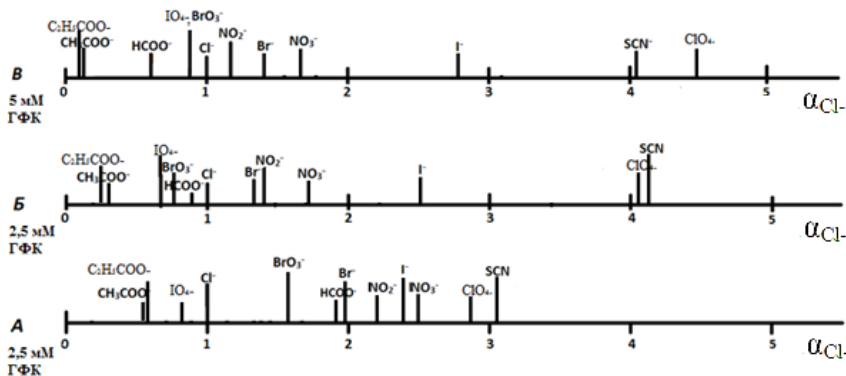


Рис. 4. Шкалы селективности относительно хлорида для колонок с сорбентами А, Б и В. рН 4,3. $F = 1,5$ мл/мин.

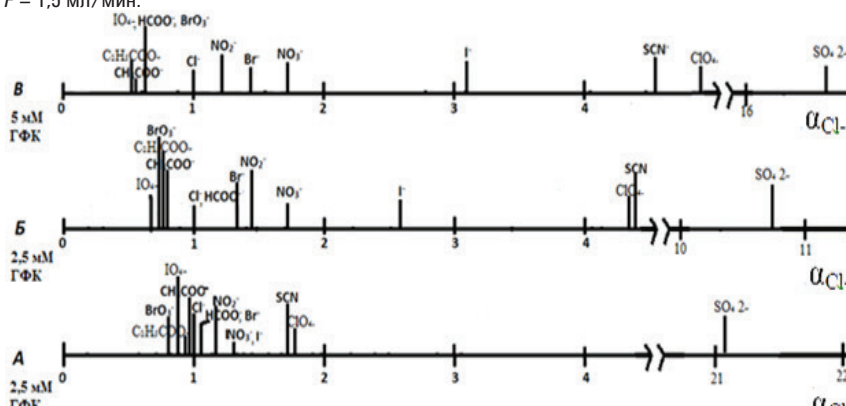


Рис. 5. Шкалы селективности относительно хлорида для колонок с сорбентами А, Б и В. рН 6. $F = 1,5$ мл/мин.

Таблица 3. Факторы удерживания и эффективности анионов на колонках с сорбентами А, Б и В. рН 4,3, $F=1,5$ мл/мин

Определяемый анион	Сорбент А Элюент 2,5 мМ ГФК		Сорбент Б Элюент 2,5 мМ ГФК		Сорбент В Элюент 5 мМ ГФК	
	k'	N (т/м)	k'	N (т/м)	k'	N (т/м)
$C_2H_3COO^-$	1.4	9700	2.2	19900	2.3	22300
CH_3COO^-	2.5	17300	2.7	19800	3.0	21900
IO_4^-	7.0	29200	6.2	17500	11.4	42900
$HCOO^-$	7.3	25800	8.4	29800	9.7	34400
BrO_3^-	6.4	33900	7.2	32000	10.6	49300
Cl^-	7.3	19900	9.1	19000	14.0	33000
NO_2^-	8.7	33300	12.5	36000	17.0	53200
Br^-	7.7	33700	11.9	38700	20.1	57100
NO_3^-	10.0	38400	16.0	44300	24.3	58900
I^-	9.3	36900	22.8	39600	39.7	61600
SCN^-	11.9	28700	36.8	21600	56.7	50300
ClO_4^-	11.3	30400	37.3	23200	63.3	54600

использование раствора ГФК с рН 4,3 в качестве подвижной фазы на сорбенте В позволяет разделить смесь из 11 анионов менее чем за 20 минут, что свидетельствует о перспективности применения такого рода анионообменников для определения органических и неорганических анионов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Krokhin O.V., Smolenkov A.D., Svintsova N.V., Obrezkov O.N., Shpigun O.A. // J. Chromatogr. A. 1995. V. 706. № 1-2. P. 93-98.
- [2] Yun Li, Jiajia Yang, Jing Jin, Xiaoli Sun, Longxing Wang, Jiping Chen, J.// Chromatogr. A, 1337 (2014) P.133-139.

Новые материалы для химического анализа

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ В ВОДАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ ПОСЛЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ НА СВЕРХШИТОМ ПОЛИСТИРОЛЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

АВТОР

Фурлетов Алексей Алексеевич

[aleksei_furletov@mail.ru]

Руководители

Толмачева В.В.,
Дмитриенко С.Г.

Кафедра аналитической химии

РЕЗЮМЕ

Синтезирован новый магнитный композитный материал на основе сверхшитого полистирола (**ССПС**) и магнитных наночастиц Fe_3O_4 . Оптимизированы условия синтеза путем варьирования массы сорбента и концентрации Fe_3O_4 . Проведена сравнительная оценка сорбционных свойств ССПС и ССПС, модифицированного магнитными наночастицами Fe_3O_4 . Показано, что нанокompозит на основе ССПС сохраняет сорбционные свойства по отношению к сульфаниламидам и легко отделяется от раствора путем наложения магнитного поля. Установлено, что количественная десорбция сульфаниламидов достигается при использовании 2 мл ацетонитрила. Реализовано сочетание сорбционного концентрирования сульфаниламидов на ССПС, модифицированном Fe_3O_4 , с их определением в элюате методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором. Правильность определения подтверждена методом «введено – найдено» на модельном растворе, приготовленном на основе речной воды (р. Москва).

В последнее время магнитные наночастицы привлекают все большее внимание химиков-аналитиков в связи с возможностью создания новых магнитных сорбционных материалов на их основе, позволяющих значительно упростить процесс пробоподготовки. В англоязычной литературе для обозначения твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием сорбентов, обладающих магнитными свойствами, введен термин «magnetic solid-phase extraction» [1].

Пробоподготовку с использованием магнитной ТФЭ осуществляют по следующей схеме. К раствору образца добавляют магнитный сорбент и проводят сорбцию в статическом режиме. Затем сорбент отделяют от раствора с помощью наложения внешнего магнитного поля. После снятия внешнего магнитного поля сорбент мгновенно теряет магнитные свойства и вновь превращается в суспензию, к которой сначала добавляют раствор для промывания, а затем элюент для десорбции сконцентрированных примесей. По сравнению с традиционным вариантом ТФЭ, этот метод обладает рядом преимуществ, таких как простота, экспрессность и уменьшение потерь на стадии пробоподготовки.

В качестве магнитного материала чаще всего используют частицы оксидов железа (Fe_3O_4 или Fe_2O_3). Сорбционные свойства этих частиц изменяют путем модификации их поверхности. Кроме того, значительно реже используют композитные сорбционные ма-

териалы, содержащие частицы Fe_3O_4 .

Цель работы — синтез магнитного сорбционного материала на основе сверхсшитого полистирола (ССПС), изучение его сорбционных свойств по отношению к сульфаниламидам и оценка возможности применения этого сорбента для группового концентрирования сульфаниламидов перед их ВЭЖХ-определением.

Хроматографическую часть работы выполняли на жидкостном хроматографе «ЦветЯгуза» с амперометрическим детектором. Разделение проводили в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Использовали хроматографическую колонку Gemini 5u C_{18} (150×4.6 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил–0.1% водный раствор H_3PO_4 (20:80, pH 3.5). Объем пробы 20 мкл. Пробу вводили с помощью петли дозатора. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.4 мл/мин.

Синтез магнитных наночастиц Fe_3O_4 проводили по методу Мас-сарта [2]. Для этого к водному раствору аммиака добавляли смесь растворов солей железа(II) и железа(III). Суспензию полученного таким образом черного студенистого осадка промывали водой до нейтрального значения pH и использовали для получения магнитного композита. В суспензии магнитных наночастиц, полученных по данной методике, преобладали частицы Fe_3O_4 размером 9–20 нм.

Синтез магнитных композитных материалов на основе ССПС про-

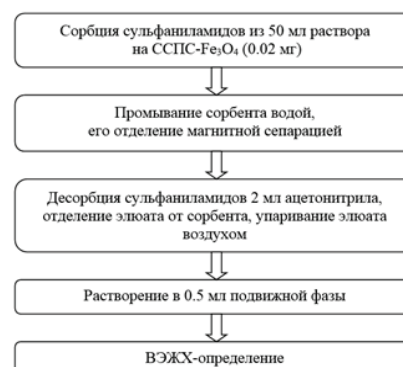


Рис. 1. Схема пробоподготовки водных растворов сульфаниламидов перед их ВЭЖХ-определением.

водили путем сорбции магнитных наночастиц Fe_3O_4 на поверхности сорбента. При выборе условий модификации варьировали объем растворов, массу сорбентов, количество наночастиц и время сорбции. Установлено, что лучшей способностью к намагничиванию обладают сорбенты, модификацию которых осуществляли из ацетонитрильных растворов объемом 2 мл, при этом содержание магнитных наночастиц должно быть не меньше 58 мг Fe_3O_4 на 1 г сорбента.

На примере сульфаметоксазола проведено сравнение сорбционных свойств модифицированного и немодифицированного ССПС. Показано, что модификация сорбента не оказывает существенного влияния ни на время установления равновесия, ни на емкость сорбента. Это может быть связано с тем, что иммобилизация магнитных наночастиц идет в мезопорах сорбента, не затрагивая микропоры, отвечающие за сорбцию сульфаниламидов [3].

В одинаковых условиях изучена сорбция остальных сульфаниламидов. Установлено, что сульфаниламиды не сорбируются на самих магнитных наночастицах Fe_3O_4 , а на немодифицированном и модифицированном ССПС все сульфаниламиды, за исключением сульфаниламида, сорбируются на 92–98%. Десорбцию сульфаниламидов осуществляли 2 мл ацетонитрила в статических усло-

Таблица 1. Степени извлечения (R , %) и десорбции ($R_{\text{дес}}$, %) сульфаниламидов на магнитных наночастицах Fe_3O_4 , ССПС и ССПС- Fe_3O_4 в статических условиях ($n = 3$, $P = 0.95$).

Соединение	R , %			$R_{\text{дес}}$, %
	мНЧ Fe_3O_4	ССПС	ССПС- Fe_3O_4	ССПС- Fe_3O_4
Сульфаниламид	0	59 ± 2	51 ± 2	98
Сульфаметоксипиридазин	0	93 ± 3	92 ± 4	87
Сульфаметазин	0	95 ± 2	92 ± 3	99
Сульфаметоксазол	0	97 ± 2	95 ± 3	94
Сульфалорпиридазин	0	98 ± 4	94 ± 2	90

Таблица 2. Результаты хроматографического определения сульфаниамидов в модельных растворах, приготовленных на основе речной воды (р. Москва), после сорбционного выделения на ССПС-Fe₃O₄ ($n = 3$, $P = 0.95$).

Соединение	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	s_r
Сульфаниламид	0.010	0.007 ± 0.003	0.15
Сульфаметоксипиридазин	0.010	0.0099 ± 0.0006	0.03
Сульфаметазин	0.010	0.010 ± 0.001	0.05
Сульфаметоксазол	0.010	0.010 ± 0.003	0.16
Сульфаклорпиридазин	0.010	0.009 ± 0.003	0.13

виях. Степени десорбции аналитов с ССПС, модифицированного магнитными наночастицами, составили 87–99% (табл. 1).

На основании выполненных исследований предложена схема пробоподготовки водных растворов сульфаниамидов перед их ВЭЖХ-определением (рис. 1). Методика применена к анализу речной воды (рис. 2). Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют о правильности результатов и хорошей воспроизводимости методики.

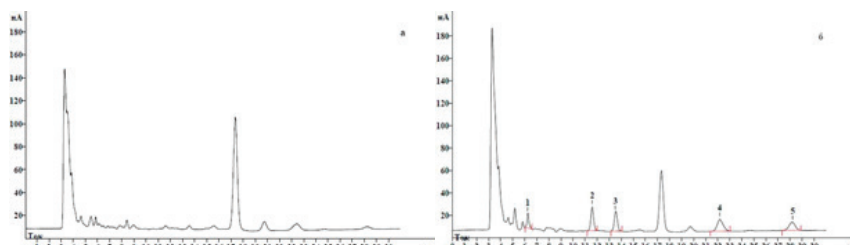


Рис. 2. Хроматограммы речной воды после сорбционного концентрирования без (а) и с добавлением (б) сульфаниамидов. 1 – сульфаниламид; 2 – сульфаметазин; 3 – сульфаметоксипиридазин; 4 – сульфаклорпиридазин; 5 – сульфаметоксазол.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Li X.-S., Zhu G.-T., Luo Y.-B., Yuan B.-F., Feng Y.-Q. // Trends Anal. Chem. 2013. V. 45. P. 233.
- [2] Massart R. // IEEE Trans. Magn. 1981. V. 2. P. 1247–1248.
- [3] Пастухов А.В., Даванков В.А., Лубенцова К.И., Косандрович Е.Г., Солдатов В.С. // Журн. физич. химии. 2013. Т. 87. № 10. С. 1721–1727.

Анализ полимеров и композитных материалов

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ FE И AU В ОБРАЗЦАХ $Fe_3O_4@Au$ СО СТРУКТУРОЙ «ЯДРО-ОБОЛОЧКА»

АВТОР

Агафонов Андрей Александрович

[agafonov1994andrey@gmail.com]

Руководитель

Локтева Е.С.

Кафедра физической химии,
лаборатория катализа и
газовой электрохимии

Авторы выражают свою
благодарность

Рудаковской П.Г. и Мажуге А.Г.
за предоставленные образцы.

РЕЗЮМЕ

Методом ААС определены содержания золота и железа в нанокompозитных системах $Fe_3O_4@Au$ и рассчитаны соотношения Fe : Au в образцах, приготовленных различными методами и очищенных хроматографическим методом или с помощью центрифугирования. Наиболее эффективным способом очистки нанокompозитов $Fe_3O_4@Au$ от примеси магнетита является хроматографическая очистка с использованием колонки Sephadex G100. Сравнение расчетных значений соотношения Fe: Au для нанокompозитных частиц, содержащих одно ядро магнетита и золотую оболочку, с полученными в работе данными подтверждает образование структуры «ядро–оболочка».

Введение

В рамках работы исследованы образцы наночастиц, предположительно имеющих структуру «ядро–оболочка», причем ядро образовано магнетитом, а оболочка — золотом (далее $Fe_3O_4@Au$). Такие частицы совмещают в себе полезные свойства как золота, так и магнетита. Предполагалось применить такие частицы в медицинских целях, для контролируемой доставки лекарственных препаратов к определенным органам в живом организме. Поверхность $Fe_3O_4@Au$ способна образовывать связь с молекулами лекарственных препаратов, а ядро из магнетита обеспечивает возможность легкой транспортировки под воздействием магнитного поля. Следовательно, наличие структуры «ядро–оболочка» является принципиальным для данного направления биомедицинского использования системы $Fe_3O_4@Au$ [1].

Цель работы: определить Fe и Au в растворах образцов $Fe_3O_4@Au$, а

также рассчитать мольные соотношения Fe:Au в растворах анализируемых образцов и, опираясь на теоретические расчеты, сделать вывод о возможности рассмотрения систем $Fe_3O_4@Au$, как систем со структурой «ядро–оболочка» и, на основе рассчитанных мольных соотношений, сделать вывод о наиболее эффективном способе очистки анализируемых систем $Fe_3O_4@Au$ от примесей непокрытого магнетита. Исследованы образцы $Fe_3O_4@Au$, приготовленные методом осаждения золота на поверхность магнетита из раствора, содержащего $HAuCl_4$ и цитрат натрия (использовали три концентрации цитрата натрия: низкую, среднюю и высокую). Образцы магнетита, в свою очередь, очищены двумя различными методами

– центрифугированием (1-кратное и 2-кратное) и хроматографическим методом на колонках Sephadex G50 и Sephadex G100. При выполнении работы образцы исследуемых наночастиц растворили в царской водке. В полученных растворах определяли железо и золото методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Работа выполнена на спектрометре Thermo Fisher Scientific серии iCE 3000 с программным обеспечением SOLAAR [2]. Для атомизации образцов использовали пламя ацетилен–воздух. В качестве аппаратуры также использованы лампы с полым катодом на железо и золото (Thermo Scientific). В ходе анализа величин абсорбции растворов исследуемых образцов методом градуировочного графика найдены значения

концентраций железа и золота, содержащихся в исследуемых растворах. Результаты определения железа и золота в образцах представлены в **табл. 1** и **2**, соответственно. На основании полученных данных вычислены мольные соотношения Fe : Au в образцах $Fe_3O_4@Au$, **табл. 3**.

Низкие значения мольных соотношений Fe:Au свидетельствуют о более высокой эффективности очистки образцов $Fe_3O_4@Au$ от примесей непокрытого магнетита. Поэтому из **табл. 3** следует, что наиболее эффективно очистка проходит с применением колонки Sephadex G100 (в обоих образцах).

Произведен расчет теоретически необходимых количеств веществ железа и золота, а также их мольных соотношений, для проверки гипотезы о соответствии исследуемых наноконструктур «ядро–оболочка». Рассчитаны теоретически необходимые количества железа и золота для реализации структуры «ядро–оболочка» с одним, двумя и тремя ядрами. В зависимости от выбора теоретических моделей наноконструктур (с 1, 2 или 3 ядрами) необходимое мольное соотношение Fe:Au варьировалось в пределах от 1:1 до 3,64:1. Сравнивая эти данные с экспериментально найденными, можно сделать вывод, что исследуемые образцы действительно могли иметь структуры «ядро–оболочка».

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Rudakovskaya P. G., Beloglazkina E. K., Majouga A. G., Zyk N. V. // Mendeleev Commun.. 2010. 20. P. 158–160.
- [2] Голубина Е.В., Туракулова А.О. Определение содержания металлов в гетерогенных катализаторах методом атомно-абсорбционной спектроскопии М.: Москва. 2013. 48 с.

Таблица 1. Найденные концентрации железа в исследуемых растворах

Образец	Концентрация (разб. раствора), мг/л	Концентрация (в нач. образце), мг/л	Доверительные интервалы, ± мг/л
$Fe_3O_4@Au^*$ (1-кратн. центрифугир.)	0.46	0.92	0.001
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G50)	0.44	0.87	0.01
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G100)-1	0.3	0.3	0.01
Fe_3O_4	0.38	76.61	0.07
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G100)-2***	0.38	0.75	0.02
$Fe_3O_4@Au^*$ (2-кратн. центрифугир.)	0.21	4.23	0.008
$Fe_3O_4@Au^{**}$ (2-кратн. центрифугир.)	0.31	0.31	0.0006

Таблица 2. Найденные концентрации золота в исследуемых растворах

Образец	Концентрация (разб. раствора), мг/л	Концентрация (в нач. образце), мг/л	Доверительные интервалы, ± мг/л
$Fe_3O_4@Au^*$ (1-кратн. центрифугир.)	0.11	0.11	0.05
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G50)	1.74	1.74	0.3
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G100)-1	0.72	0.72	0.2
Fe_3O_4	0.31	0.31	0.05
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G100)-2	2.5	2.5	0.09
$Fe_3O_4@Au^*$ (2-кратн. центрифугир.)	0.87	0.87	0.1
$Fe_3O_4@Au^{**}$ (2-кратн. центрифугир.)	0.70	0.70	0.07

Таблица 3. Мольные соотношения Fe : Au в анализируемых растворах

Раствор	Мольные соотношения Fe : Au
$Fe_3O_4@Au^*$ (1-кратн. центрифугир.)	29 : 1
$Fe_3O_4@Au^*$ (2-кратн. центрифугир.)	17 : 1
$Fe_3O_4@Au^{**}$ (2-кратн. центрифугир.)	2 : 1
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G50)	1,8 : 1
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G100)-1	1,5 : 1
$Fe_3O_4@Au$ (Sephadex G100)-2	1 : 1

Анализ полимеров и композитных материалов

СОРБЦИЯ СТРОНЦИЯ-90 И ИТТРИЯ-90 НА СУЛЬФАТЕ БАРИЯ, ПОЛУЧЕННОМ С ПОМОЩЬЮ УЗ-ГЕНЕРАТОРА И В ВОДОРАСТВОРИМОЙ МАТРИЦЕ САХАРОЗЫ

АВТОР

Твердохлеб Дарья Андреевна

[dtverd4@gmail.com]

Руководитель

Бердонос С.С.

Кафедра радиохимии

РЕЗЮМЕ

Синтезированы в условиях облучения УЗ и в матрице сахарозы частицы сульфата бария и охарактеризованы по результатам измерения удельной поверхности по БЭТ. Из данных электронно-микроскопического исследования следует, что в образцах, полученных с помощью УЗ-излучения, преобладают частицы овальной формы, что достаточно близко к сферической форме частиц, получаемых при простом смешивании растворов. Частицы, полученные в матрице сахарозы, имеют форму, близкую к параллелепипедной. Средний размер частиц сульфата бария в матрице сахарозы существенно меньше, чем размер частиц, полученных с использованием УЗ-генератора. Данные по сорбции стронция-90 на сульфате бария свидетельствуют о том, что сорбция протекает в две стадии. На первой стадии, в течение 6–20 мин после начала сорбции, происходит переход стронция-90 в приповерхностный слой частиц (как обычно при сорбции на полидисперсных осадках). При этом первая стадия для сульфата бария, полученного в сахарозе, завершается за 16–18 мин, а для сульфата бария, полученного при помощи УЗ-излучения — за 6–8 мин. Это может быть объяснено различием в дефектности полученных частиц. На второй медленной стадии происходит переход радионуклидов в объем твердой фазы.

Сульфат бария — классический сорбент аналитической химии. Его низкая растворимость в воде, термическая стабильность (температура плавления около 1580°C) сочетаются с отсутствием фазовых переходов при нагревании от комнатной температуры вплоть до температуры плавления. Вместе с тем это вещество образует кристаллы различной формы, что позволяет на его примере выявлять влияние особенностей поверхности на сорбционные свойства. Сульфат бария как сорбент интересовал многие поколения химиков-исследователей, особенно специалистов аналитической химии. Общеизвестны классические работы по изучению сорбции Кольтгофа, который рассмотрел процессы стабилизации (старения) полидисперсных препаратов этого соединения и его сорбционные возможности.

С течением времени удалось накопить обширную информацию о возможных формах кристаллов сульфата бария и условиях их образования в водной среде в виде длинных тонких иголок (вискеров), пластинок и др. Правда, по литературным данным, вискеры сульфата бария образуются в довольно экзотических условиях (в присутствии редких ПАВ, их большой концентрации) и в малых даже не количествах, а просто в виде отдельных микрочастиц. Поэтому представляло интерес проведение новых исследований, направленных на получение необычных форм кристаллов сульфата бария и характеристику

их сорбционных свойств.

Цель работы состояла в получении препаратов сульфата бария в облучаемой УЗ водной среде и в объеме частиц сахарозы и выявлении влияния условий синтеза на сорбционные свойства кристаллов. Для получения кристаллов в условии УЗ-поля использовали УЗ-облучение водной среды частотой 2,34 МГц. Методика синтеза приведена в [1].

Второй подход к получению препаратов сульфата бария предполагал получение полидисперсных препаратов в объеме прессованной сахарозы. Как следует из электронно-микроскопических снимков, в объеме сахарозы присутствуют полости трех типов: малые округлые поры длиной 0,15–0,2 мкм, полости искривленной овальной формы и широкие полости небольшой глубины. Синтез

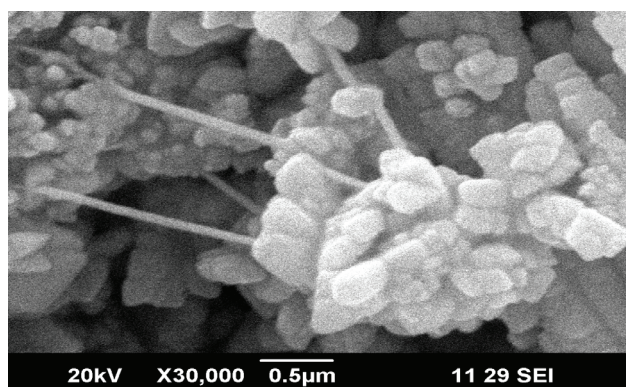


Рис. 1. Электронно-микроскопический снимок сульфата бария, полученных в матрице сахарозы при использовании 0,1 моль/л растворов сульфата натрия и нитрата бария, времени экспонирования 6 мин.

$BaSO_4$ проводили, размещая на противоположных сторонах кубика из сахарозы по 0,375 мл исходных растворов $BaCl_2$ и Na_2SO_4 заданной концентрации. Оба раствора перемещались по объему матрицы навстречу друг другу. К тому моменту, когда эти растворы встречались, они были насыщенными по сахарозе. Взаимодействие растворов приводило к образованию зародышей кристаллов $BaSO_4$. На последующий рост этих зародышей и образование кристаллов влияли: 1) значение

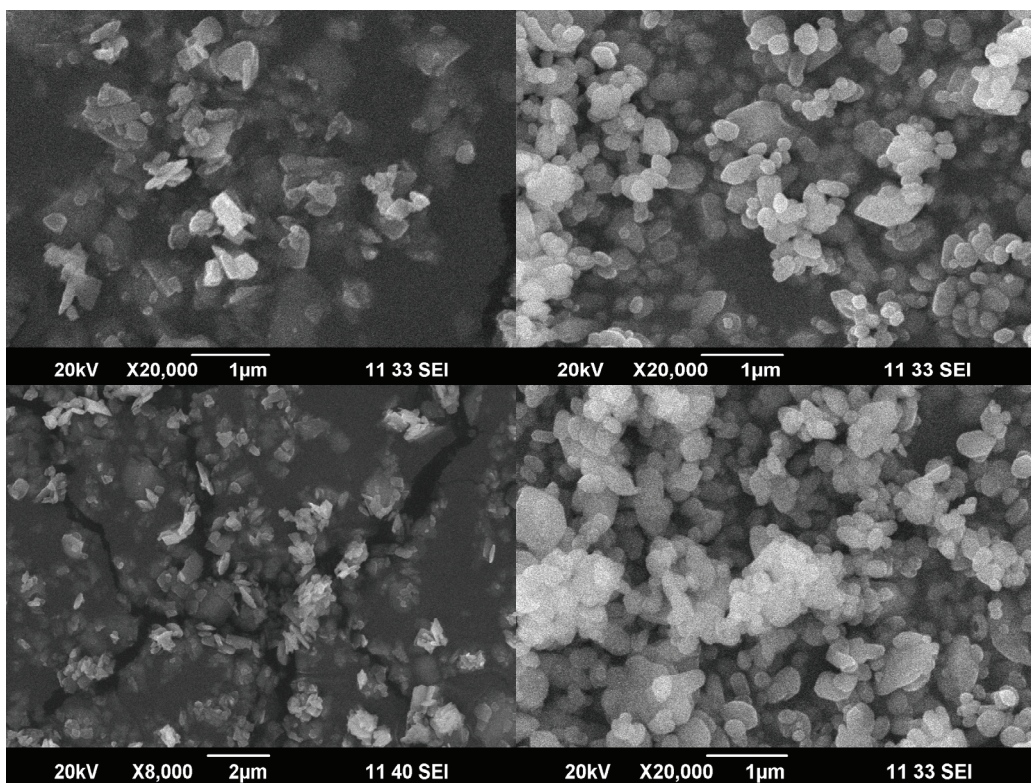


Рис. 2. Электронно-микроскопические снимки сульфата бария, полученного в матрице из сахарозы.

Рис. 3. Электронно-микроскопические снимки сульфата бария, при воздействии уз-излучения.

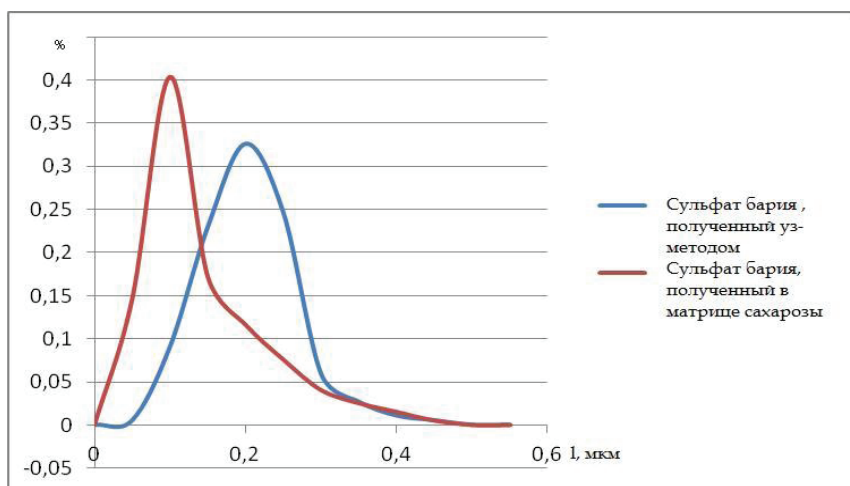


Рис. 4. Функции распределения частиц по размеру.

пересыщения; 2) форма полостей, 3) температура.

Возникающие в порах первичные частицы $BaSO_4$ далее могли присоединиться к уже сформировавшимся кристалликам по строго определенным граням, что приводило к разветвленной форме образующихся агломератов.

Для наблюдения формы агломератов сахарозу растворяли в небольшом объеме воды при $50^\circ C$ и образовавшиеся частицы $BaSO_4$ отделяли фильтрованием суспензии. Форма собранных на фильтре частиц показана на электронно-микроскопических снимках. Элементный состав частиц подтвержден результатами

анализа их энергодисперсионных спектров.

Как следует из рассмотрения этих снимков, получены частицы сульфата бария в виде отдельных плоских частиц и трехмерных агломератов, а при использовании нитрата бария и сульфата натрия — длинные (до 150–200 мкм) нитеобразные частицы — вискеры. В качестве ионов, сорбцию которых на поверхности сульфата бария анализировали, выбраны ионы, меченные стронцием-90 (в равновесии с дочерним иттрием-90 или вне условий достижения векового равновесия). Стронций-90 — важнейший радионуклид, обуславливающий

техногенное загрязнение Земли. (при бета-распаде ядер стронция-90 (период полураспада 30 лет) возникает также бета-радиоактивный иттрий-90).

Перед проведением сорбционного эксперимента проводили измерение удельной поверхности полученных препаратов по адсорбции-десорбции азота (расчет $S_{уд}$ по уравнению БЭТ) на приборе ASAP 2010 V 2.00. Значения $S_{уд}$ оказались равны, соответственно $5,67 \text{ м}^2/\text{г}$ (для сульфата бария полученного в УЗ-генераторе) и $10,14 \text{ м}^2/\text{г}$. Для изучения сорбции использовали водный раствор $^{90}\text{Sr}(+^{90}\text{Y})\text{Cl}_2$ без носителя (ОАО «Изотоп», Россия) с исходной удельной активностью $4 \text{ МБк}/\text{мл}$, с помощью которого готовили рабочий раствор с удельной активностью $4\text{--}5 \text{ кБк}/\text{мл}$. Все измерения радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном спектрометре TriCarb-2700 TR (Packard Ind., США), используя черенковское излучение.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бердоносков С.С., Бердоносова Д.Г., Знаменская И.В. // Химическая технология — 2002. — №8. — с. 2-11.

Биология и медицина

ЭКСПРЕСС–МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕФАДРОКСИЛА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ БИОИНЖЕНЕРИИ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *E. COLI*

АВТОР

Дробот Виктор Валерьевич

[linux776@gmail.com]

Руководитель

Панин Н.В.,
Шведас В.-Ю. К.

*НИИ физико-химической биологии
имени А. Н. Белозерского
МГУ, отдел биокинетики,
лаборатория ферментативных
модификаций физиологически
активных соединений*

РЕЗЮМЕ

Разработана, оптимизирована и охарактеризована селективная спектрофотометрическая методика экспрессного определения цефадроксила как для чистого вещества, так и в присутствии компонентов (7-АДЦК и 4-ГФГА), используемых при ферментативном синтезе антибиотика. Получена количественная характеристика разработанной методики: установлены градуировочные зависимости, молярные коэффициенты поглощения образующегося хромофора и рассчитаны основные метрологические характеристики. Применимость методики на практике показана на примере установления растворимости цефадроксила в условиях ферментативной реакции; на основании полученных данных для нативной пенициллинацилазы из *E. coli* определён максимальный выход продукта реакции и время его достижения при выбранных условиях реакции. Предложено объяснение увеличения чувствительности методики при наличии примесей, механизм фотометрической реакции и возможная структура образующегося хромофора.

Одним из наиболее динамично развивающихся направлений современной биотехнологии является белковая инженерия промышленно значимых ферментов. Пенициллинацилаза из *E. Coli* (ПА) является одним из наиболее изученных и востребованных биотехнологических объектов [1]. Уникальные свойства фермента позволяют использовать его каталитический потенциал для получения полусинтетических бета-лактамовых антибиотиков [2]. В последнее время в белковой инженерии фермента для тонкой подстройки каталитической активности особое место стали занимать подходы так называемого полурационального дизайна [3], которые, однако, требуют чёткого понимания взаимосвязи «структура–свойства» и наличия хороших методов скрининга. Однако для внедрения полурациональных подходов требуется разработка быстрых методов скрининга. Кроме того, для промышленных задач помимо каталитической активности или стабильности фермента необходимо изучить одну из наиболее сложных функций — максимальный выход реакции. Для этой цели в настоящее время используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [4], однако, она имеет такие серьёзные недостатки, как высокий расход элюента и длительность анализа

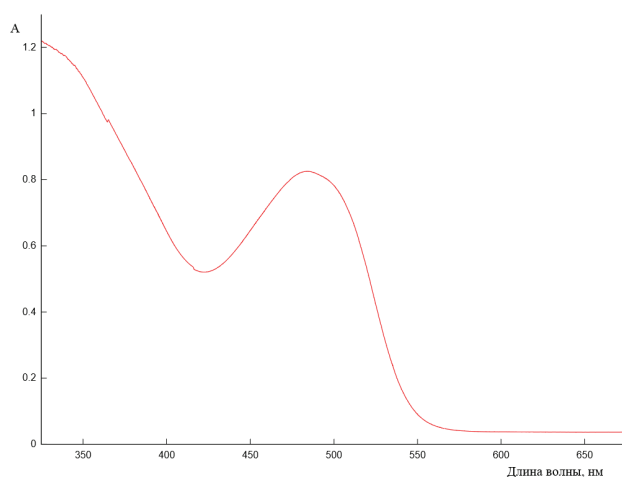


Рис. 1. Спектр молекулярного поглощения хромофора цефадроксила.

Таблица 1. Оптимальные условия проведения фотометрической реакции

Параметр	Значение
Концентрация щёлочи в реакционной смеси, М	0.5
Температура нагревания, °С	60.0
Время нагревания, мин	6.0
Время охлаждения, мин	10,0–17,0
λ_{max} , нм	483.5

(определение продукта в одной пробе занимает порядка десяти минут).

Цель работы — разработка быстрой, удобной и селективной методики спектрофотометрического определения целевого компонента смеси (антибиотик цефадроксил), совместимой с плащечными технологиями.

Работа выполнена на спектрофотометре УФ–видимой областей спектра Shimadzu UV-1601, точность измерения составляет 1.0 ± 10^{-4} А, максимально измеряемое значение оптической плотности 3.0 А. Шаг изменения длин волн 0.1 нм.

Для хромофора, получаемого путём обработки цефадроксила водным раствором щёлочи, получен спектр молекулярного поглощения (рис. 1) с $\lambda_{\text{max}} = 483.5$ нм. Кроме того, установлены оптимальные условия, позволяющие получать максимальное значение оптической плотности для фиксированной концентрации антибиотика в растворе (табл. 1). Для раствора чистого цефадроксила, а также для случая, когда в растворе в значительном ко-

личестве присутствуют вещества, используемые при ферментативном синтезе антибиотика — 7-аминодезацетоксицефалоспороновая кислота (7-АДЦК) и 4-гидроксибензилглицинамид (4-ГФГА) — установлены градуировочные зависимости. Для чистого цефадроксила $A = (9.6 \pm 0.1) \pm 10^2 c + (0.031 \pm 0.008)$ ($P = 0.95$, $n = 20$, $r = 0.998$), для случая наличия в растворе 7-АДЦК и 4-ГФГА $A = (1.523 \pm 0.007) \pm 10^3 c + (0.07 \pm 0.004)$ ($P = 0.95$, $n = 20$, $r = 0.999$). Для обоих вариантов определения цефадроксила рассчитаны метрологические характеристики, приведённые в табл. 2.

Из приведённых данных видно, что чувствительность методики возрастает в присутствии 7-АДЦК и 4-ГФГА. Мы предполагаем, что это связано с тем, что хромофор цефадроксила имеет тенденцию к распаду на два других хромофора, отвечающих хромофорам 7-АДЦК и 4-ГФГА, так же образующихся в результате обработки водным раствором щёлочи и нагревании.

Дополнительно установлено несколько интересных экспериментальных фактов, таких, как зависимость скорости фотометрической реакции от концентрации антибиотика в растворе, влияние на скорость реакции различных сред, окислителей и восстановителей, а также зависимость реакционной способности от структурных особенностей антибиотика. Так, установлено, что наблюдается линейная зависимость между концентрацией антибиотика в растворе и скоростью фотометрической реакции. Данный факт го-

Таблица 2. Метрологические характеристики для двух вариантов определения цефадроксила ($P = 0.95$, $n = 20$)

	Чувствительность, л/(моль × см)	Предел обнаружения, мкг/мл	Нижняя граница определяемых содержаний, мкг/мл
Чистый цефадроксил	$(9.6 \pm 0.1) \times 10^2$	12.4	41.3
Цефадроксил при наличии 7-АДЦК и 4-ГФГА	$(1.523 \pm 0.007) \times 10^3$	4.8	16.1

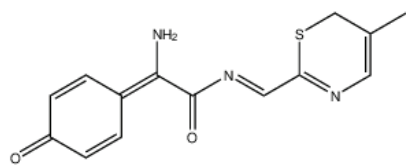


Рис. 2. Предполагаемая структурная формула хромофора цефадроксила

ворит в пользу того, что реакция, по-видимому, является реакцией первого порядка по антибиотику и, скорее всего, внутримолекулярна. Также реакция существенно ускоряется в присутствии окислителей (ионы меди(II), пероксид водорода) и щёлочи; восстановители и кислая среда сильно снижают скорость реакции. Кроме того, в реакцию вступают лишь фенольные производные бета-лактамовых антибиотиков (т.е., содержащие фрагмент 4-ГФГА в качестве донорной части).

На основании перечисленных выше фактов предложена возможная структура образующегося хромофора (рис. 2). Однако, для более точного установления структурных аспектов хромофора требуется более тщательное исследование, включающее ЯМР-спектроскопию и масс-спектрометрические методы.

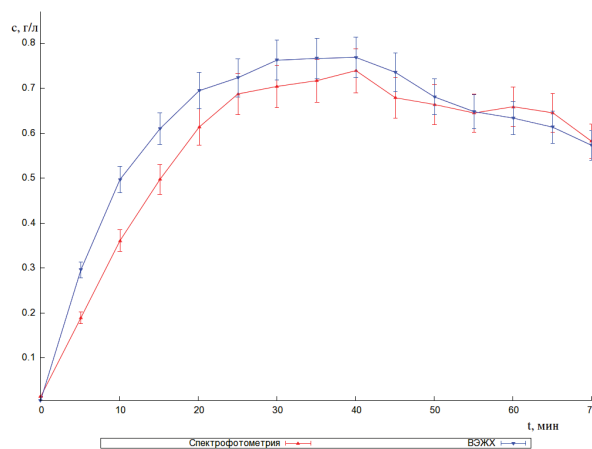


Рис. 3. Исследование ферментативной реакции синтеза цефадроксила двумя подходами.

Показано применение предложенного подхода для исследования ферментативной реакции. В частности, установлена максимальная растворимость цефадроксила при условиях ферментативной реакции ($T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} 6.3$, $c_{7\text{-АДЦК}} = c_{4\text{-ГФГА}} = 0.015 \text{ M}$, $c_{\text{ПА}} = 4.5 \times 10^{-7} \text{ M}$). Полученное значение составляет $12.0 \pm 0.9 \text{ г/л}$ ($P = 0.95$, $n = 3$), в то время как результаты ВЭЖХ-анализа дают соответствующее значение $12.0 \pm 0.4 \text{ г/л}$ ($P = 0.95$, $n = 3$).

Кроме максимальной растворимости установлен максимальный выход продукта и время его достижения в ферментативной реакции синтеза антибиотика из

7-АДЦК и 4-ГФГА (рис. 3). Максимальный выход составляет $13.6 \pm 0.9\%$ ($P = 0.95$, $n = 15$) через 40 мин после начала реакции.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Sakaguchi K., Murao S. // J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 1950. V. 23. P. 411
- [2] Kaufmann W., Bauer K. // Naturwissenschaften. 1960. V. 47. P. 474–475
- [3] Jager S. et al. // J. Biotechnol. 2008. V. 133. No. 1. P. 18–26
- [4] Gabor E.M., Janssen D.B. // Protein Eng. Des. Sel. 2004. V. 17. No. 7. P. 571–579

Биология и медицина

ОБНАРУЖЕНИЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO CARPIO*) И ИХ СРАВНЕНИЕ С ЯИЧНЫМ КУРИНЫМ ЛИЗОЦИМОМ ПО КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

АВТОР

Гасанова Дария Алановна

[sova-sipuha@hotmail.com]

РУКОВОДИТЕЛИ

Кондратьева И.А.,
Левашов П.А.¹

1 – Кафедра химической энзимологии

2 – Международный учебно-научный
биотехнологический центр МГУ
имени М.В. Ломоносова

РЕЗЮМЕ

Показано присутствие в сыворотке крови карпа (*Cyprinus carpio carpio*) двух различных бактериолитических ферментов, специфичных к *E. coli*. Молекулярные массы ферментов равны $(46 \pm 11) \times 10^3$ и $(21 \pm 6) \times 10^3$ Да.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальным является исследование бактериолитических ферментов. Эти белки широко применяют в биохимии и биотехнологии для разрушения клеток, а также в фармацевтике как высокоспецифичная альтернатива антибиотикам. Кроме того, исследование данной группы ферментов важно для понимания особенностей работы защитной системы различных организмов. Особый интерес представляет недавно открытая бактериолитическая активность регуляторного белка интерлейкина-2, содержащегося в сыворотке крови у ряда позвоночных, в том числе у человека. Предполагают, что с функциями этого белка может быть связан ряд аутоиммунных заболеваний.

Цель работы — обнаружение бактериолитической активности в сыворотке крови карпа (*Cyprinus carpio carpio*). В ходе исследования проведены первичная очистка бактериолитических факторов, оценка активности факторов и определение их молекулярной массы.

Первичная очистка включает отбор и подготовку пробы сыворотки крови карпа (*Cyprinus carpio carpio*), осаждение белков с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и разделение их по молекулярной массе при помощи эксклюзионной хроматографии (хроматографический материал – Sephadex G-75 Superfine). Для количественной характеристики бактериолитической активности применён турбидиметрический анализ. Скорость лизиса клеток рассчитана как:

$$V = \frac{1}{t - t_{ini}} \frac{A_{ini} - A(t)}{A_{ini} - A_{min}}$$

t_{ini} — время начала процесса; A_{ini} и A_{min} — соответственно начальное и минимальное (конечное, при полном лизисе всех клеток) значения A_{650} суспензии клеток *E. coli*; V — скорость лизиса. Для определения белка в препаратах использованы модифицированный микробиуретовый метод и метод Брэдфорд, в зависимости от концентрации. Также содержание белка оценено по формуле Калькара:

$$c \text{ (мг/мл)} = 1,45A_{280} - 0,74A_{260}$$

Выбраны условия, подходящие для исследования ферментативного лизиса клеток. Бактериолитическая активность обнаружена в исходном препарате сыворотки (рис. 1). Зависимость скорости лизиса клеток от концентрации добавляемого препарата в спектрофотометрической кювете аппроксимируется линейно. Также выявлена активность в препаратах белка после фракционирования с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ для фракции, выпавшей в осадок в диапазоне 30–60% от насыщения соли.

Определена градуировочная зависимость хроматографической колонки при помощи белков-стандартов. Произведено хроматографическое разделение

Активность,
у.е.

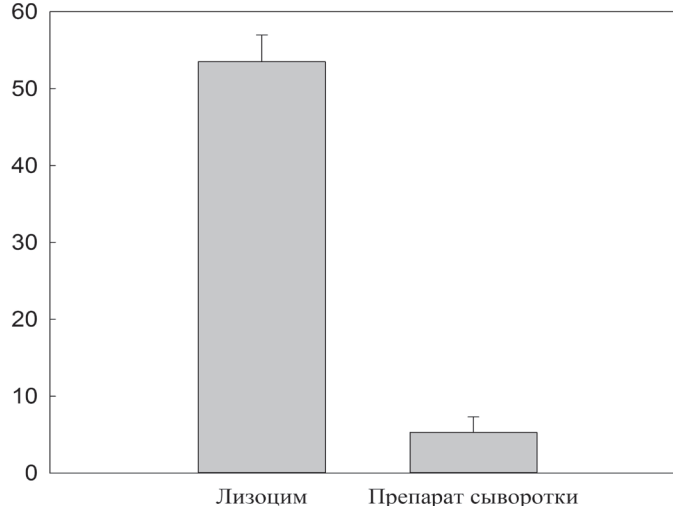


Рис. 1. Сравнение бактериолитической активности куриного яичного лизоцима (0,02 мг/мл) и препарата сыворотки крови карпа (общий белок 5,1 мг/мл) в одинаковых условиях. Буферный раствор — 0,02М Tris-HCl, pH 8,60. За одну условную единицу активности принята скорость изменения оптической плотности суспензии клеток *E.coli* (650 нм) на 10^{-3} единиц за секунду с учётом коэффициента разведения препарата фермента.

белковой фракции, выпадающей в осадок при 30-60% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Бактериолитическая активность в экспериментах обнаружена в двух группах фракций. Фракции с наибольшей активностью соответствуют молекулярным массам веществ 46 ± 11 и 21 ± 6 кДа (рис. 2).

Во всех фракциях, полученных в экспериментах хроматографического разделения, измерена величина A_{280} ; в активных фракциях определён белок и оценена бактериолитическая активность.

В процессе разделения белков удельная активность бактерио-

литических факторов возрастает (см. табл. 1).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Кулаев И.С. // Соросовский образовательный журнал. 1997. Т.3. С. 23.
- [2] Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S.V., Belogurova N.G., Levashov A.V. // Anal. Chem. 2010. V.82. P. 2161-2163.
- [3] Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Семёнова М.В., Гитинов М.М., Левашов А.В., Левашов П.А. // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38, № 3. С. 315.

Таблица 1. Данные об общей концентрации белка ($n = 4$, $P = 0,95$) и оценка активности фермента в препаратах, полученных в ходе первичного разделения. За одну условную единицу активности принята скорость изменения оптической плотности суспензии клеток *E.coli* ($\lambda = 650$ нм) на 10^{-3} единиц за секунду с учётом коэффициента разведения препарата фермента

Препарат	V, мл	c, мг/мл	Активность, у.е./мл	Удельная активность, у.е./мг	Степень очистки	Суммарная активность, у.е.
Разбавленная сыворотка (титр 1:7)	8.00	5.1±0.7	5.30	1,04	-	42,4
Фракция 8	1.05	0.40±0.06	3.45	8,63	8	3,6
Фракция 9	1.05	0.17±0,03	1.90	11,2	11	2,0
Фракция 10	1.05	0.05±0,02	1.75	35,0	34	1,8
Фракция 11	1.05	0.01±0,01	2.20	5,5×10 ²	5,3×10 ²	2,3
Фракция 12	1.05	0.01±0,01	0.85	1,1×10 ²	1,0×10 ²	0,9
Фракция 13	1.05	0.01±0,01	0,10	1,0×10 ²	96	0,1
Стандарт (лизоцим)	-	0.020±0,001	53,50	2,7×10 ³	-	-

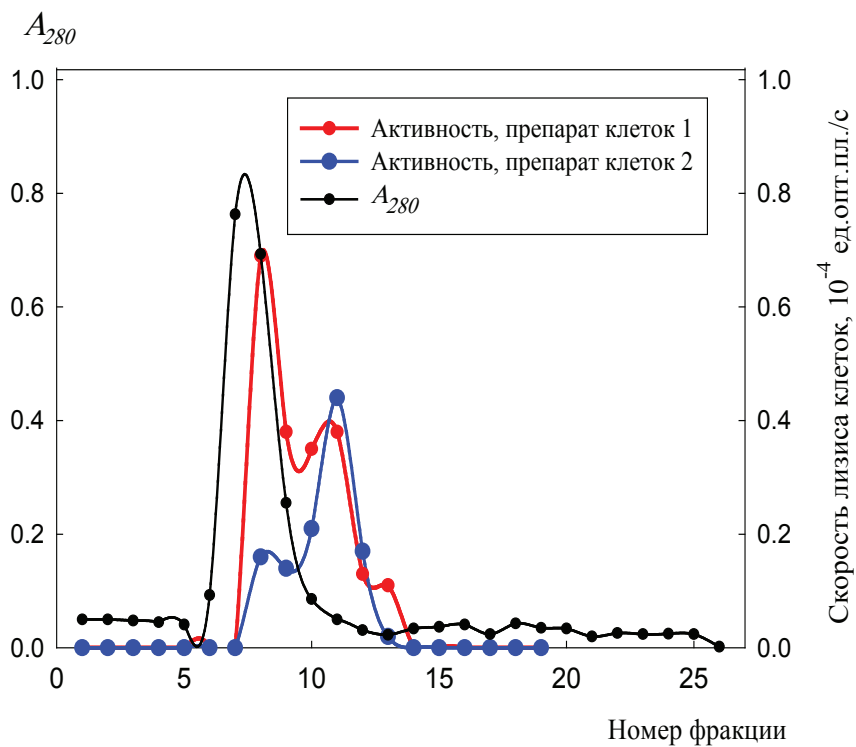


Рис.2. Хроматограмма препарата, разделённого на колонке с Sephadex G-75 при 20оС. Буферный раствор - 0,05M Tris-HCl с добавлением 0,15M NaCl, pH 8,00.

[4] Левашов П.А., Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Левашов А.В. // Биохимия. 2012. Т.77, № 11. С.1567.

[5] Ярилин А.А. Основы иммунологии. М., «ГЭОТАР-МЕДИА», 2010. 749 с.

[6] Кусочек П.А. Сравнение бактериолитических свойств ферментов, выделенных из разных животных. Курсовая работа. М., 2012.

[7] Практикум по иммунологии. Под редакцией И.А. Кондратьевой и А.А. Ярилина. 2-е издание, исправленное и дополненное. М.: Издательский дом «Академия», 2004.

Биология и медицина

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В АНАЛИЗЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

АВТОР

Кусочек Павел Александрович

[paul_kus@mail.ru]

Руководитель

Остерман И.А.

Кафедра химии природных соединений



Agilent Technologies

РЕЗЮМЕ

Методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии выделена фракция действующего компонента культуральной жидкости грамположительной бактерии *Bacillus pumilus* и установлена структура методами ЯМР и масс-спектрометрии. Оптимизированы условия хроматографического выделения фракции действующего соединения: неподвижная фаза C_{18} , состав подвижной фазы: 20% ацетонитрил, 75% вода, 5% ТФУ буфер. После 15 мин создается градиент ацетонитрила 15%/мин для полного элюирования всех компонентов смеси. Проведено сравнение ингибирующей концентрации 50% клеточного роста дикого штамма *E. coli* выделенного вещества с аналогичной концентрацией для коммерческого антибиотика эритромицина. Для полученного соединения данная величина оказалась в 2,3 раза меньше, чем для эритромицина.

Введение

В последние годы во всем мире регистрируется значительный рост устойчивости возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций к антимикробным препаратам. Появление резистентных патогенов является причиной все большего беспокойства, так как глобальная смертность от лекарственно устойчивых бактериальных инфекций продолжает увеличиваться ежегодно. Например, по этой причине только в США каждый год умирает 100000 граждан. В таких условиях экспрессный поиск новых антибиотиков и экспрессное определение механизма их действия крайне актуальны.

Около половины применяемых в настоящее время антибиотиков действуют на рибосому и являются очень перспективными, так как от трансляции напрямую зависит жизнедеятельность бактерии. Механизмы действия могут быть различными: некоторые антибиотики вызывают ошибки в ходе синтеза белка, другие замедляют скорость трансляции или блокируют рибосому на различных стадиях ее функционального цикла. Таким образом, диапазон возможных антибактериальных средств, влияющих на трансляцию довольно широк. Вследствие этого важен поиск новых потенциальных антибиотиков, взаимодействующих с рибосомой, в культуральных жидкостях почвенных микроорганизмов.

Цель работы — Оптимизация условий выделения фракции действующего компонента при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ, выделение из отобранных при помощи скрининга образцов культуральных жидкостей фракции действующего компонента в предложенных условиях и установление его структуры; определение для выделенных соединений концентрации ингибирования 50% клеточного роста дикого штамма *E. coli*.

Работа выполнена на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 с использованием ВЭЖХ колонки Luna C₁₈(2) (5µm) 4.6 × 250 mm (Phenomenex). В ходе работы применялся особый метод скрининга, основанный на использовании штаммов бактерий с плазмидой, содержащей гены двух флуоресцентных белков. Экспрессия одного белка (RFP) использовалась в

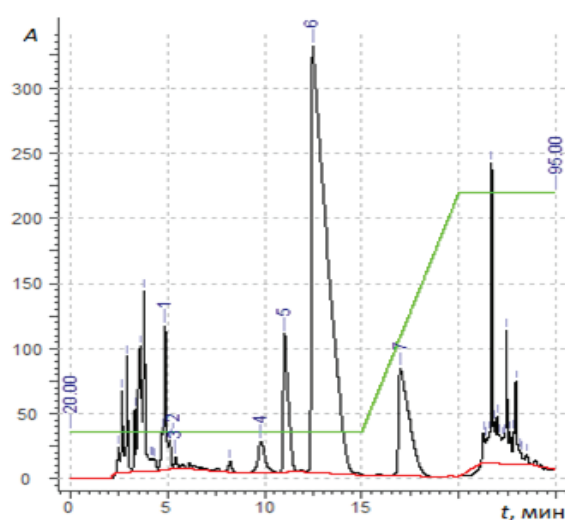


Рис. 1. Хроматограмма культуральной жидкости *Bacillus pumilus* в подобранных условиях. Концентрация ацетонитрила до 15 минуты постоянна и равна 20%. ТФК-буфер, 5%, вода. Rs(4,5) = 2,10; Rs(5,6) = 1,33/

качестве внутреннего контроля. Экспрессия второго белка (GFP) поставлена в зависимость от скорости трансляции. При торможении трансляции детектировалась флуоресценция GFP. В результате работы протестировано несколько сотен культуральных жидкостей почвенных микроорганизмов. Антибактериальная активность детектирована у ряда образцов. Для исследования выбрана культуральная жидкость грамположительной бактерии *Bacillus pumilus*.

В результате первичного хроматографирования с помощью исследовательского градиента 0–95% ацетонитрила за 30 мин и последующей детекции антибактериальной активности установлена нужная фракция действующего компонента. (На хроматограмме пик данной фракции обозначен цифрой 5). Затем проведен ряд экспериментов с вариацией градиентной программы с целью получения оптимального разрешения данного пика с соседними. Характеристики пиков пробных хроматограмм вводились в программу ACD/LC Simulator, кото-

рая прогнозировала оптимальный градиент для наилучшего разрешения пика 5 с соседними пиками 4 и 6. Программа осуществляла оптимизацию, основываясь на требованиях, сформулированных в ведущих фармакопеях под названием «Критерии пригодности хроматографической системы». Вид хроматограммы, полученной в спрогнозированных условиях, представлен на рис. 1. Значения разрешений для нужного пика при разных стратегиях элюирования представлены в табл. 1. Первые две строки в таблице соответствуют пробным хроматограммам. Последняя — хроматограмме в спрогнозированных условиях.

На основании предсказанных и реальных времён удерживания наиболее отчетливых пиков, полученных при хроматографировании в смоделированных условиях, рассчитано относительное стандартное отклонение времени удерживания. Оно составило 0,55% (n=8). Таким образом, предсказательная сила метода оказалась достаточно высока. После выделения фракции соединения, в которой детектирована антибактериальная активность методами ЯМР и масс-спектрометрии установлена структура данного соединения. В литературе [1] описано соединение бацифелацин похожей структуры

Таблица 1. Влияние градиента ацетонитрила на разрешение между пиком активной фракции и соседними пиками.

Градиент ацетонитрила, % / мин	Rs(4,5)	Rs(5,6)
1,50	1,47	1,17
3,17	1,04	0,97
Изократика 20	2,10	1,33

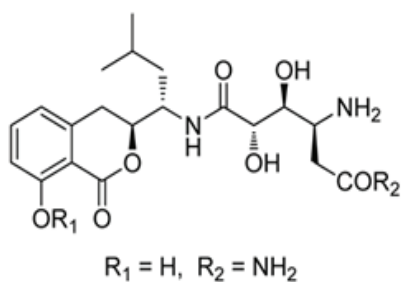


Рис. 2. Выделенное вещество

с функциональными группами, поглощающими в том же диапазоне, что и выделенное вещество. Молярный коэффициент поглощения бацифелацина при длине волны 314 нм составляет 4900 л/(моль см). В дальнейших измерениях использовалось это значение. На рис. 2 и 3 изображены структуры выделенного компонента и бацифелацина соответственно. Затем с помощью спектрофотометра NanoDrop2000 с шириной кюветы 1 мм и длине волны 314 нм определен действу-

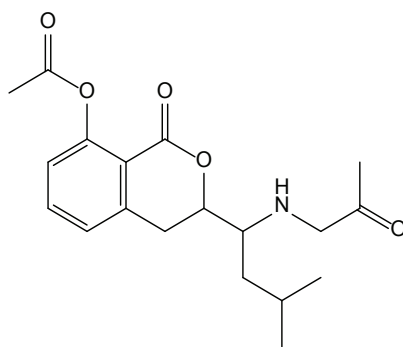


Рис. 3. Бацифелацин

ющий компонент. Ввиду малого количества культуральной жидкости и отсутствия чистого соединения концентрация вещества во фракции не могла быть точно определена ни методом добавок, ни методом градуировочного графика. Вследствие этого концентрация соединения во фракции носила оценочный характер. Затем турбидиметрическим методом выявлена зависимость оптической плотности клеточной суспензии выращенной биомассы от концентрации антибиотиков,

внесенных в систему в начале процесса роста: выделенного вещества и эритромицина. Оптическая плотность клеточной суспензии, при которой достигалось 50% ингибирование клеточного роста составила $0,255 \pm 0,002$ ($P=0,95$, $n=5$). Количество клеток при значении оптической плотности 0,255 составляет порядка $0,3 \times 10^9$ КОЕ. Для выделенного вещества данное значение оптической плотности достигается при концентрации 18 мкМ. Для эритромицина — при 42 мкМ. Таким образом, действующее вещество ингибирует клеточный рост *E. coli* в два раза при концентрации в 2,3 раза меньше, чем это требуется для эритромицина.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Okazaki H., Kishi T., Beppu T. et al. // *J. Antibiot.* 1975. V. 28. P. 717 – 719.

Биология и медицина

ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ ПРОТИВ ОНКОНЕВРАЛЬНОГО АНТИГЕНА РЕКОВЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КАК МЕТОД РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

АВТОР

Крячков Вячеслав Александрович

[teokorsak@mail.ru]

РУКОВОДИТЕЛИ

Головастова М.С.,
Тихомирова Н.К.,
Зерный Е.Ю.

*НИИ ФХБ им. Белозерского, Отдел
сигнальных систем клетки,
Лаборатория зрительной рецепции*

РЕЗЮМЕ

Показано, что при использовании иммуноблоттинга достигается наиболее достоверное обнаружение аутоантител против рековерина в образцах сыворотки крови. Концентрация рековерина, необходимая для обнаружения соответствующих аутоантител в образцах сыворотки крови методом иммуноблоттинга, составляет 0.3 мкг/мкл при объеме 1 мкл. Кросс-реакция антител против рековерина с нейрональными Ca^{2+} -сенсорами NCS1 и GCAP2 при иммуноблоттинге не наблюдается. Частота встречаемости аутоантител против рековерина у пациентов с уронефрологическими онкозаболеваниями в исследуемой группе составляет 4.3%.

ВВЕДЕНИЕ

С каждым годом онкологические заболевания получают все более широкое распространение. При этом они могут сопровождаться протеканием паранеопластических неврологических синдромов (ПНС) — неврологических нарушений, сопровождающих некоторые раковые заболевания, но в то же время удаленных от места злокачественного новообразования и его метастазов. Механизм их развития заключается в том, что злокачественные клетки начинают вне нервной системы экспрессировать белки, в норме специфичные для нейронов. В связи с наличием гематотканевого барьера, защищающего все нервные структуры от повреждающего воздействия иммунной системы, организм впервые встречается с подобными белками и идентифицирует их, как чужеродные. ПНС развивается, когда антитела пересекают гематотка-

невый барьер и начинают разрушать нейроны, экспрессирующие соответствующий антиген, называемый онконевральным.

Примером онконеврального антигена может служить рековерин — Ca^{2+} -связывающий белок, локализованный в фоторецепторных клетках сетчатки глаза. Паранеопластический синдром, ассоциированный с ним, получил название ретинопатии, ассоциированной со злокачественной опухолью, или KAP-синдрома. Данный синдром может наблюдаться при целом ряде злокачественных образований, однако в большинстве случаев он ассоциирован с такими типами опухолей, как мелко-клеточная и немелкоклеточная карцинома легких. Также неврологическое расстройство обычно появляется задолго до идентификации рака и более чем у половины пациентов является первым показателем наличия опухоли. Таким образом, выявление антирековериновых аутоантител в сыворотке крови при KAP-синдроме — потенциальный неинвазивный метод, позволяющий сказать о наличии новообразования на ранней стадии. Все это открывает вопрос о возможности использования антител против рековерина в качестве диагностического маркера в некоторых типах раковых заболеваний.

Цель работы — рассмотрение методов и отработка условий иммунологического обнаружения антител против нейронального Ca^{2+} -сенсора рековерина в образцах сыворотки крови экспериментальных животных и пациентов с уронефрологическими онкозаболеваниями.

На первом этапе работы проведена экспрессия рековерина в бактериальных клетках с использо-

ванием ранее полученной генетической конструкции на основе плазмидного вектора pET11d. Для получения гомогенного препарата белка использовалась Ca^{2+} -зависимая гидрофобная хроматография, основанная на способности рековерина обратимо взаимодействовать с гидрофобными носителями в присутствии ионов кальция. Поскольку использование этого метода не приводило к получению гомогенного белка, проведена дополнительная стадия очистки белка методом высокоэффективной анионообменной хроматографии.

Для подбора условий и отработки метода детекции антител против рековерина первоначально использовался метод неконкурентного ИФА. Использовались сыворотки крови от 3-х кроликов *Dryctolagus cuniculus*, предварительно иммунизированных полученным гомогенным препаратом рековерина. Титр антител против рековерина в трех сыворотках составил 12800, 6400, 12800 соответственно. Таким образом, в целом метод ИФА может быть использован для достижения заявленных целей, т.е. детекции антител против рековерина в сыворотке крови онкологических пациентов. В то же время метод имеет ряд недостатков. Во-первых, это достаточно высокий расход сыворотки. Во-вторых, при больших разведениях сыворотки наблюдаются максимумы поглощения, значительно увеличивающие погрешность измерений. Вследствие этого, далее рассмотрен альтернативный подход к определению содержания антител против рековерина в сыворотке крови — метод иммуноблоттинга.

Для мониторинга эффективности образования комплекса рекове-

рин-антитело при иммуноблоттинге исследована иммунореактивность различных разведений аффинно-очищенных поликлональных антител против рековерина. Для этого использовали постоянную концентрацию рековерина (0,5 мкг на дорожку), на фоне которой варьировали концентрацию аффинно-очищенных антител. Наиболее подходящая концентрация антител составила 0,3 мкг/мл. Для выявления оптимального количества рековерина, при котором регистрируется сигнал с антирековериновыми антителами, провели эксперименты, в рамках которых варьировали количество антигена в диапазоне от 0,05 до 1,5 мкг на дорожку на фоне фиксированной концентрации антител против рековерина. Оптимальный сигнал регистрируется при количестве рековерина 0,5 мкг. Использование более высокой концентрации антигена нецелесообразно, поскольку может привести к неспецифической реакции с другими антителами, присутствующими в сыворотке. Таким образом, концентрация рековерина, необходимая и достаточная для использования в экспериментах по определению содержания аутоантител в сыворотке крови онкологических пациентов, по нашим данным составляет 0,5 мкг/мкл.

Для оценки специфичности связывания антител против рековерина с целевым антигеном провели также иммуноблоттинг с нейрональными Ca^{2+} -сенсорами NCS1 и GCAP2 т.е. гомологичными белками, имеющими с рековерином консервативные участки аминокислотной последовательности. Использовали рековерин (1 мкг), NCS1 (1 мкг) и GCAP2 (1 мкг). В качестве первичных анти-



Рис. 1. Иммуноблот рековерина, окрашенный антителами против этого белка; варьируется концентрация антител на фоне постоянной концентрации антигена. Полоски соответствуют следующему содержанию антител, взятых на пробу (объем 1 мл): 1 — 0,01 мкг; 2 — 0,1 мкг; 3 — 0,3 мкг; 4 — 0,6 мкг; 5 — 0,8 мкг; 6 — 1,5 мкг.

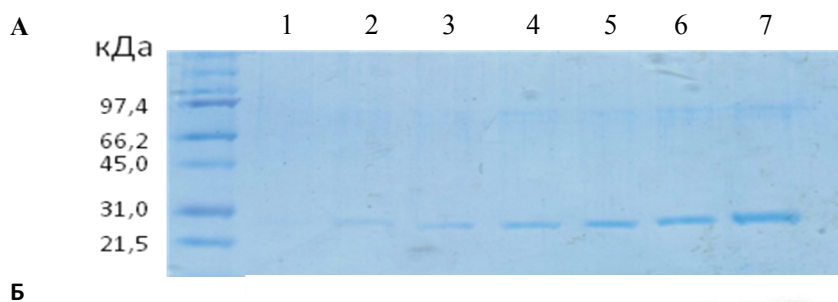


Рис. 2. А. Электрофореграмма рековерина в ПААГ в присутствии SDS при следующем содержании белка (мкг): 1 – 0,05; 2 – 0,1; 3 – 0,3; 4 – 0,5; 5 – 0,7; 6 – 1,0; 7 – 1,5. Б. Иммуноблот рековерина, окрашенный антителами против этого белка; варьируется количество антигена на фоне постоянной концентрации антител (0,3 мкг на пробу).



тел использовали очищенные антитела против рековерина, взятые в количестве 0,3 мкг на пробу. Согласно полученным результатам, антитела против рековерина не вступают в реакцию с другими белками семейства нейрональных Ca^{2+} -сенсоров, что позволяет говорить о высокой селективности исследуемого подхода. С использованием полученного ранее препарата рековерина провели исследование встречаемости аутоантител против этого белка в образцах сыворотки крови пациентов с диагнозом рак почки и рак предстательной железы. Методом иммуноблоттинга проанализировано 70 образцов сыворотки крови, полученных от пациентов с уронефрологическими онкозаболеваниями, включая 45 образцов сыворотки крови от пациентов с раком почки и 25 образцов от пациентов с раком предстательной железы. Для проверки достоверности проводимого скрининга сывороток крови анализ также проведен в контрольной группе, состоящей из 5 человек с неотягощенным онкологическим и неврологическим анамнезом. При начальном разведении 1 : 20 сыворотка крови пациентов с аутоантителами про-

тив рековерина интенсивно окрашивает антиген на иммуноблоте. В сыворотке пациентов с раком почки антитела против рековерина присутствовали в 2-х случаях. В сыворотке пациентов с раком предстательной железы антитела против рековерина выявляются только в одном случае. В контрольных образцах сыворотки крови аутоантител против рековерина не выявлено. При инкубации мембран с антигенами в присутствии сывороток крови разных пациентов на мембране детектировались полосы, отличающиеся интенсивностью, что объясняется различным титром аутоантител в сыворотке крови пациентов. Таким образом, в сыворотке крови трех пациентов: двух — с раком почки и одного — с раком предстательной железы, обнаружены аутоантитела против рековерина. В совокупности, частота встречаемости аутоантител против рековерина у пациентов с уронефрологическими онкозаболеваниями в исследуемой группе составила 4,3 %.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Филиппов П.П. // Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. № 9. С. 25–30.



Рис. 3. Иммуноблот рековерина (1), NCS1 (2) и GCAP2 (3), окрашенный антителами против рековерина

1 2 3

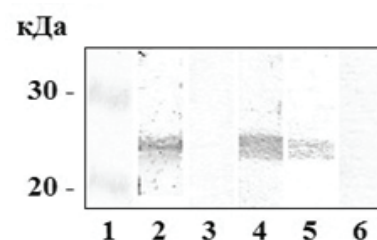


Рис. 4. Определение аутоантител против рековерина в сыворотках крови методом иммуноблоттинга. Стандарты молекулярных масс белков, окрашенные Ponsceau (дорожка 1); рековерин, окрашенный: очищенными поликлональными (моноспецифическими) антителами против рековерина (дорожка 2), сывороткой крови здорового индивида (дорожка 3); сывороткой крови, содержащей аутоантитела против рековерина от пациента с раком почки (дорожка 4), сывороткой крови, содержащей аутоантитела против рековерина от пациента с раком предстательной железы (дорожка 5), сывороткой крови от пациента с раком предстательной железы не содержащей аутоантител против рековерина (6).

- [2] Darnell R.B., Posner J.B. // *Engl. J. Med.* 2003. V. 349. P. 1543–1554.
- [3] Graus F., Keime-Guibert F., Rene R., et al. // *Brain.* 2001. V. 124. P. 1138–1148.
- [4] Chung S.M., Selhorst J.B. // *Ophthalmic Clin. North Am.* 1992. P. 5587–5596.
- [5] Hooks J.J., Tso M.O., Detrick B. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001. V. 8. P. 853–858.

Биология и медицина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЭЖХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИКУМАЦИНА А ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ШТАММА *BACILLUS PUMILUS*

АВТОР

Новолаев Тимофей Игоревич

[timofei_novolaev@mail.ru]

Руководитель

Остерман И.А.

Кафедра химии природных соединений



Agilent Technologies

РЕЗЮМЕ

При помощи обращеннофазовой ВЭЖХ получен амикумацин А в количестве, необходимом для рентгеноструктурного анализа комплекса антибиотика с рибосомой. Определена минимальная ингибирующая концентрация амикумацина А для штаммов *E. coli* BW25113 и JW5503.

Введение

В последнее время по всему миру регистрируются случаи значительной устойчивости возбудителей различных заболеваний к антимикробным препаратам. Это связано, в первую очередь, с развитием у микроорганизмов механизмов резистентности к тому или иному препарату в связи с многократным его применением. Резистентность, в свою очередь, значительно повышает выживаемость данного вида, способствует его размножению. Поэтому встает задача поиска, выделения и очистки новых антибактериальных препаратов и изучение их механизма действия. *Цель работы* — выделить, охарактеризовать и очистить амикумацин А, определить его минимальную ингибирующую концентрацию и место связывания с рибосомой.

Создана репортерная конструкция для поиска новых антибиотиков [1]. С помощью данной конструкции в культуральной жидкости обнаружен амикумацин А (рис. 1). Культуральная жидкость *Bacillus pumilus* перед проведением хроматографии предварительно обработана исследователями из НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе (НИИИ-НА). Далее проводилась очистка препарата обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2). Разделение проводили на колонке Phenomenex HPLC Luna 5 μ m C₁₈(2) 100A 250x4.60мм с градиентным элюированием (0-80% ацетонитрил) в ацетате аммония (рН 7.5) со скоростью потока 1 мл/мин. Оптимальное детектирование данного пика происходит при длине волны 314 нм. Но в ходе эксперимента детектирование проводилось при 210 нм, т.к. в этой области поглощает большинство примесей культу-

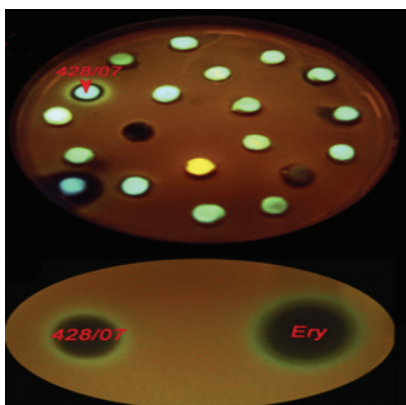


Рис. 1. Обнаружение амикумацина А (на рисунке обозначен как 428/07)

ральной жидкости, что позволяет увидеть, как разрешается нужный пик с пиками примесей. Для пика активного вещества определены хроматографические параметры (табл. 1).

Таблица 1. Хроматографические параметры для пика амикумацина А

Фактор удерживания	Число теоретических тарелок	Ширина, мин	R _s (AmcB, AmcA)	R _s (AmcA, правый пик.)
6.94	7530	0.8	1.53	3.24

Для проверки качества первоначальной очистки, мы ввели 1 мкл собранной ранее фракции активного вещества и снова провели обращенно-фазовую хроматографию (рис. 3).

Следующим этапом работы стало турбидиметрическое определение минимальной ингибирующей концентрации амикумацина А для штаммов *E. coli* BW25113 и JW5503 (Δ tolC) (рис. 4). Штамм Δ tolC *E. coli* является нокаутом по гену белка TolC. Белок TolC отвечает за экспорт различных метаболитов из клетки, в том числе он экспортирует и антибиотики. Использование штамма Δ tolC позволяет снизить минимальную ингибирующую концентрацию и определять механизм действия антибиотиков, которые не действуют на обычный штамм *E. coli* дикого типа.

Оптическая плотность клеточной суспензии, при которой считалось достижение 50% ингибирования клеточного роста, вычис-

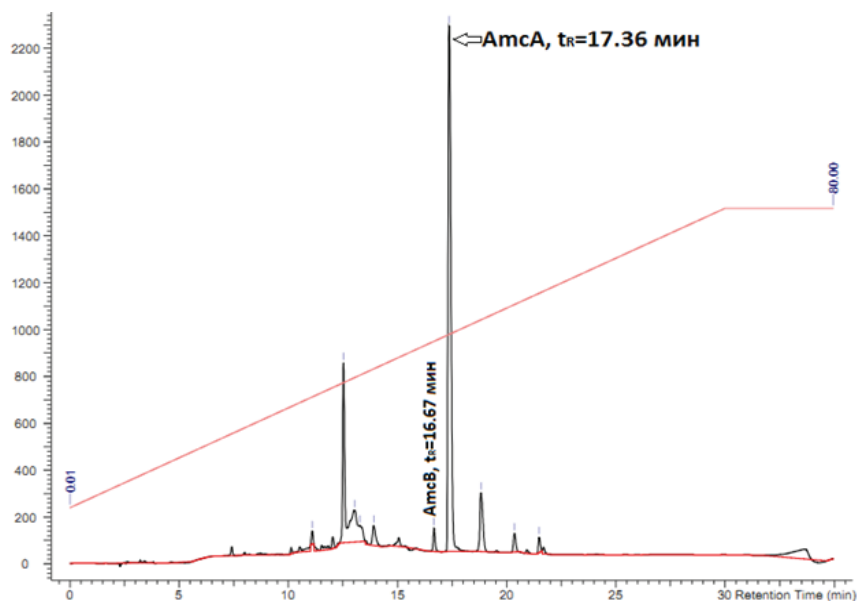


Рис. 2. Очистка амикумацина А.

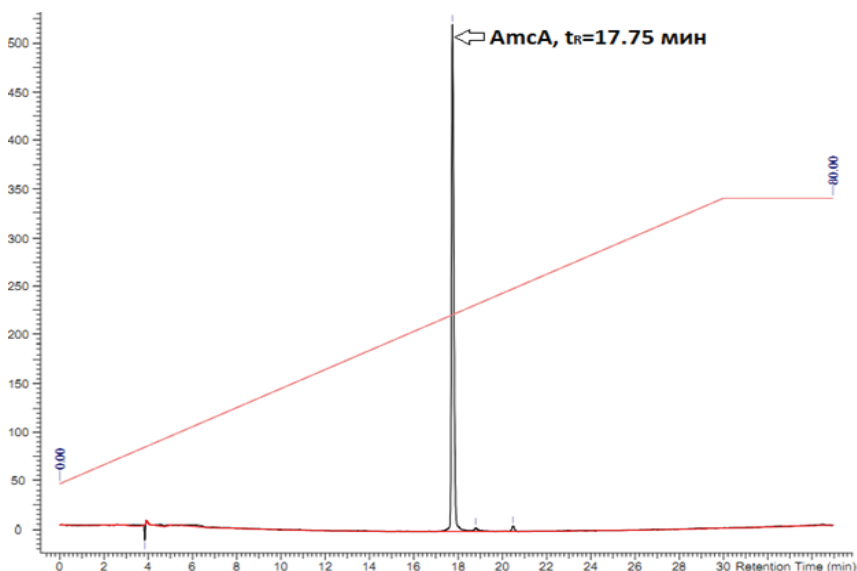


Рис. 3. Проверка качества очистки амикумацина А.

лялась как половина разницы между максимальной и минимальной оптической плотностью. Для штаммов BW25113 и JW5503 (Δ tolC) A50% составила $0,397 \pm 0,005$. В [2] установлена зависимость поглощения клеточной суспензии *E. coli* при 650 нм от концентрации клеток в системе (рис. 5). Количество клеток при этом значении оптической плотности составляет порядка $0,4 \times 10^9$ КОЕ. Для амикумацина А данное значение оптической плотности достигается при 25 мкг/мл для штамма BW25113 и 0,5 мкг/мл для штамма JW 5503 (Δ tolC). Для эритромицина — 50 мкг/мл и 2,5

мкг/мл, соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Сравнение минимальной ингибирующей концентрации (мкг/мл) для амикумацина А (AmcA) и эритромицина (Ery).

Amc A	Ery	
BW 25113	25	50
JW 5503 (Δ tolC)	0.5	2.5

Как видно из полученных данных амикумацин А является более эффективным ингибитором бактериального роста чем, используемый в настоящее время эритромицин. Поэтому амикумацин А является перспективным лекарственным препаратом для лечения различных заболеваний бактериальной природы. Выделенный нами антибиотик

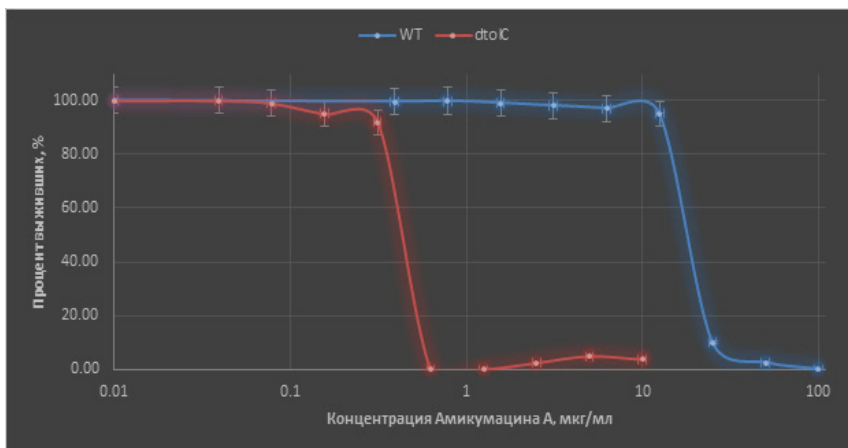


Рис. 4. Минимальная ингибирующая концентрация амикумацина А для штаммов *E. coli* BW25113 и JW5503.

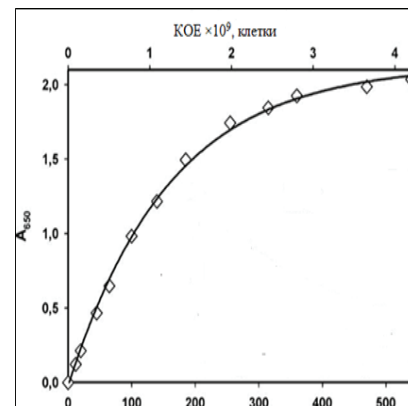


Рис. 5. Зависимость оптической плотности при 650 нм от концентрации клеток *E. coli* в системе.



Рис. 6. Участок связывания амикумацина А с рибосомой.

использован для определения точного места связывания амикумацина А с рибосомой (рис. 6). Видно, что амикумацин А связывается очень близко к Е-сайту рибосомы. Также он взаимодействует с рРНК и мРНК по

средством водородных связей и стекин-взаимодействия.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysoev V.O., Boykova YV, Efremenkova O.V., Svetlov M.S., Kolb

V.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., and Dontsova O.A. // *Antimicrob Agents Chemother.* 2012. №4. p. 1774-83.

[2] Levashov, P. A., Sedov, S.A., Shipovskov S. et al. // *Anal.Chem.* 2010.V. 82. P. 2161-2163.

МАКСИМАЛЬНО ТОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИ МИНИМАЛЬНЫХ ЗАТРАТАХ ВРЕМЕНИ И ТРУДА

The Measure of Confidence



Шприцевые фильтры Captiva компании "Аджилент"

Сегодня, чаще чем когда-либо ранее, в хроматографии используется фильтрация для обеспечения жестких требований к анализу и бескомпромиссных запросов к качеству, скорости и воспроизводимости.

За много лет специалисты компании "Аджилент" пришли к выводу, что фильтрация проб перед выполнением анализов ВЭЖХ, УВЭЖХ и ВЭЖХ-МС помогает повысить производительность системы и качество анализа, и этот опыт отражен в новой линейке шприцевых фильтров Captiva.

Достижение высокой производительности, а также увеличение точности результатов без увеличения продолжительности процесса хроматографии

Как и все другие продукты фильтрации компании "Аджилент", шприцевые фильтры Captiva компании "Аджилент" разработаны специалистами по хроматографии для специалистов по хроматографии. Эти продукты предоставляют следующие преимущества.

- **Очень широкий выбор.** Продукты для фильтрации Captiva компании "Аджилент" предоставляются в широком ассортименте размеров и форматов и с различными мембранами для обработки любой матрицы и пробы.
- **Подтверждение чистоты.** Все шприцевые фильтры Captiva поставляются с сертификатом для ВЭЖХ или ВЭЖХ-МС, что *гарантирует* сверхнизкие уровни наблюдаемой экстракции компонентов мембраны.
- **Высокая скорость.** Наши новые шприцевые фильтры отличаются высокими скоростями потока и максимальной емкостью при нанесении образца.
- **Непревзойденное качество.** Каждый шприцевой фильтр сконструирован с корпусом из высокосортного беспримесного полипропилена и надежно запаян для предотвращения разрывов и обеспечения целостности проб.

Если для методики важны оптимальный уровень производительности, высокий срок службы колонок и целостность проб, в вопросе повышения эффективности анализов воспользуйтесь качеством продукции "Аджилент" — признанного мировым лидером в области хроматографии.

Фильтрация проб перед выполнением анализов ВЭЖХ, УВЭЖХ и ЖХ-МС крайне важна для достижения оптимальной производительности системы.

Шприцевые фильтры Captiva компании "Аджилент" максимально увеличивают скорость процессов за счет самых высоких в отрасли показателей расхода и вместимости.



Agilent Technologies
Компания "Аджилент Текнолоджиз"

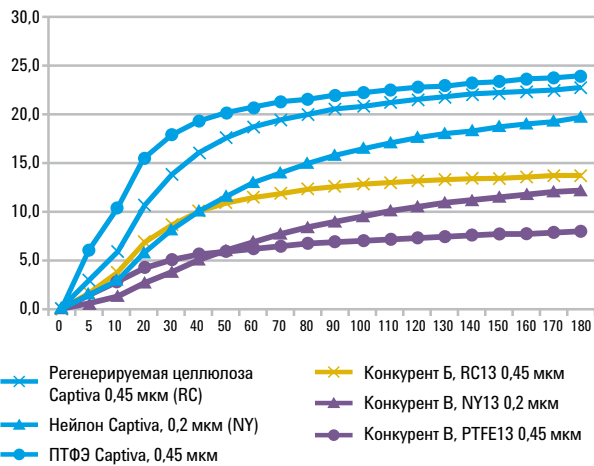
В подтверждение, что шприцевые фильтры Sartiva компании "Аджилент"

помогут увеличить скорость, разрешение и срок службы колонок

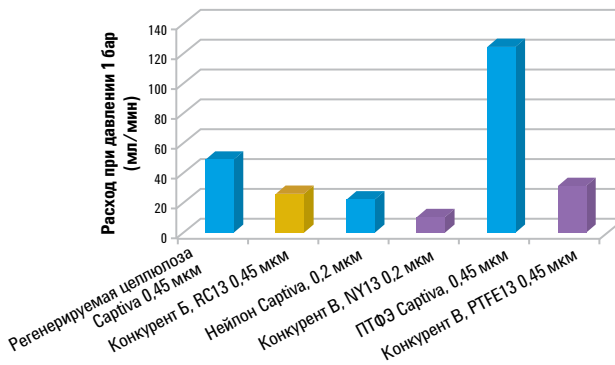
Не фильтруете пробы? Это следует делать. Даже небольшое количество попавших в колонку частиц может привести к возникновению проблем, таких как засорение входного отверстия, увеличение противодавления, изменение времени удерживания, снижение разрешения и сокращение срока службы колонок. Это особенно касается колонок высокого давления с размером частиц менее 2 мкм, которые более чувствительны к увеличению давления.

Шприцевые фильтры Sartiva Premium обеспечивают очень высокую емкость и максимальную скорость потока из представленных на сегодняшнем рынке.

Вместимость (объем) 15-мм шприцевых фильтров с течением времени (с пробами с высоким содержанием микрочастиц)



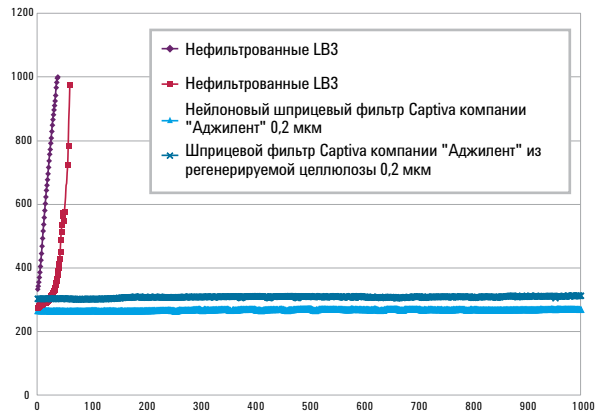
Скорость потока для 15-мм шприцевых фильтров Sartiva Premium



Максимальные скорость потока и вместимость. Показано, что, шприцевые фильтры Sartiva компании "Аджилент" сочетают самую высокую в отрасли емкость и скорость потока, обеспечивая таким образом максимальную эффективность анализов.

Фильтрация проб перед проведением анализа ВЭЖХ обеспечила значительное увеличение срока службы колонок.

Воздействие фильтрации при нанесении на колонку А с размером частиц менее 2 мкм раствора гранул латекса 0,3 мкм: воздействие фильтрации на срок службы колонок с размером частиц менее 2 мкм



Число вводов нефильтрованных или фильтрованных проб латексных гранул 0,3 мкм

Отсутствует увеличение противодавления: 0,05-процентный раствор латексных гранул был профильтрован с помощью шприцевых фильтров Sartiva компании "Аджилент". Обратите внимание, что при этом противодавление колонок не увеличилось даже после 1000 вводов проб. Кроме того, прозрачность раствора после фильтрации позволяет предположить успешное удержание латексных гранул.

От приготовления проб до разделения...

компания "Аджилент" обеспечивает полный контроль процесса анализа

Наши специалисты, обладающие более чем 40-летним опытом производства полимерных и силикагелевых сорбентов, постоянно разрабатывают все новые усовершенствования для обеспечения максимально высокой производительности.

Экономичные планшеты Captiva Econofilter компании "Аджилент"

Наши высококачественные планшеты Econofilter поставляются в больших упаковках и идеально подходят для лабораторий с большим объемом анализов, которым требуется быстрая и эффективная фильтрация по разумной цене. Дополнительная информация: www.agilent.com/chem/filtration

Продукты для фильтрации Captiva компании "Аджилент" для любых образцов и проб

- **НОВЫЕ однорубочные фильтры Captiva ND и ND^{Lipids}** допускают пробы большего размера, чем фильтрационные планшеты и шприцевые фильтры. Идеальный вариант для удаления микрочастиц, белков и липидов.
- **Неподтекающие фильтрационные планшеты Captiva ND** обеспечивают полное удаление микрочастиц и осажденных белков в пять раз быстрее по сравнению с центрифугированием.
- **Неподтекающие фильтрационные планшеты Captiva ND^{Lipids}** удаляют липиды, вызывающие эффект ионной супрессии, обеспечивая устранение липидов и белков.
- **96-луночные фильтрационные планшеты Captiva** упрощают подготовку осажденных белков для ВЭЖХ/МС и также подходят для стандартной фильтрации проб.
- **Патронные фильтры Captiva** предоставляют все преимущества фильтрации продуктов Captiva в стандартном формате патрона для ТФЭ.

Колонки ZORBAX компании "Аджилент" для ВЭЖХ: превосходная воспроизводимость и стабильность

На всех этапах — от анализа до разработки метода и контроля качества колонки ZORBAX компании "Аджилент" для ВЭЖХ

обеспечивают чувствительность, точность и надежность, необходимые для методов с высокими требованиями.

Продукты для пробоподготовки "Аджилент" обеспечивают безопасность методов и минимизируют загрязнения

Только компания "Аджилент" предоставляет полный модельный ряд продуктов для пробоподготовки путем анализа, фильтрации, очистки и ТФЭ перед хроматографическими и масс-спектрометрическими анализами.

Дополнительная информация: www.agilent.com/chem/sampleprep

Обеспечение максимальной производительности и эффективности с помощью принадлежностей "Аджилент"

- компания "Аджилент" предоставляет широкий набор принадлежностей для хроматографии и масс-спектрометрии, а также атомной и молекулярной спектроскопии.
- под маркой CrossLab компания "Аджилент" предоставляет широкий ассортимент принадлежностей для хроматографии, совместимых с приборами других производителей.
- **надежно и** максимально увеличить эффективность и производительность лаборатории с помощью наборов флаконов для МС-анализа, вставок испарителя Ultra Inert и других новейших принадлежностей.

Для получения дополнительной информации воспользуйтесь ссылкой www.agilent.com/chem/supplies



Интерактивное руководство по выбору шприцевых фильтров помогает быстро и просто подобрать шприцевой фильтр, оптимально подходящий для используемого метода. Перейти по ссылке: www.agilent.com/chem/SelectFilters

Ваше время бесценно... так же, как ваши пробы

Высококачественные шприцевые фильтры Captiva компании "Аджилент" полностью готовы к использованию, а также протестированы и сертифицированы как не содержащие веществ, поглощающих УФ-излучение, при типичных длинах волны ВЭЖХ с водой, метанолом и ацетонитрилом. Таким образом, вы можете быть уверены, что экстрагируемые вещества и другие загрязняющие вещества не повлияют на состав проб.

Информация для размещения заказа: Улучшенные фильтры, 100 шт. в упаковке.

Описание	Диаметр (мм)	Размер пор (мкм)	Сертификация	Корпус	Каталожный №
ПТФЭ	4	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5082
	4	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5083
	15	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5084
	15	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5085
	25	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5086
	25	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5087
Нейлон	15	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5088
	15	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5091
	25	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5092
	25	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5093
ФЭС	4	0,45	ВЭЖХ/МС	Полипропилен	5190-5095
	4	0,2	ВЭЖХ/МС	Полипропилен	5190-5094
	15	0,2	ВЭЖХ/МС	Полипропилен	5190-5096
	15	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5097
	25	0,2	ВЭЖХ/МС	Полипропилен	5190-5098
	25	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5099
Регенерированная целлюлоза	4	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5106
	4	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5107
	15	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5108
	15	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5109
	25	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5110
	25	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5111
Ацетилцеллюлоза	28	0,2	ВЭЖХ	МБС	5190-5116
	28	0,45	ВЭЖХ	МБС	5190-5117
Стекло микроволокно	15	нет данных	ВЭЖХ/МС	Полипропилен	5190-5120
	28	нет данных	ВЭЖХ	МБС	5190-5122

Многослойные фильтры, 100 шт. в упаковке.

Описание	Диаметр (мм)	Размер пор (мкм)	Сертификация	Корпус	Каталожный №
Стекло микроволокно/ ПТФЭ	15	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5126
	15	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5127
	25	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5128
	25	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5129
Стекло микроволокно/ нейлон	15	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5132
	15	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5133
	25	0,2	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5134
	25	0,45	ВЭЖХ	Полипропилен	5190-5135

Разовые шприцы Captiva, 100 шт. в упаковке.

Объем	Каталожный №
5 мл	9301-6476
10 мл	9301-6474
20 мл	5062-8534

Для получения дополнительной информации о продуктах для фильтрации Captiva компании "Аджилент" перейдите по ссылке:
www.agilent.com/chem/Filtration

Чтобы обратиться к представителю компании "Аджилент" или к уполномоченному дистрибьютору компании "Аджилент", перейдите по ссылке:
www.chromnews.com/ru/contactus

Информация может быть изменена без предварительного уведомления.
© Agilent Technologies, Inc., 2012 г.
Отпечатано в США, 2 октября 2012 г.
5991-1278RU





Agilent Technologies