

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Севко Дарья Анатольевна

**КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОСТЕРОИДОВ
С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫХ
СОРБЕНТОВ И ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д. х. н., в. н. с. Беклемишев Михаил Константинович

Москва – 2016

Содержание

Список сокращений	4
Введение	5
I. Обзор литературы	8
I.1. Методы поверхностного импринтинга	8
I.1.1. Полиэлектролитные мультислои	8
I.1.2. Молекулярно-импринтированные неорганические носители	13
а) Носители на основе кремнезема	13
б) Магнитные частицы	21
в) Носители на основе оксида титана(IV)	27
I.2. Методы определения фитостероидов	30
а) Тонкослойная хроматография	32
б) Высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография	34
в) Идентификация и подтверждение структуры фитостероидов	40
II. Экспериментальная часть	44
II.1. Реактивы и оборудование	44
II.2. ВЭЖХ-МС/МС определение фитостероидов	46
II.3. Методики получения и изучения свойств молекулярно-импринтированных сорбентов/носителей	46
II.3.1. Импринтинг на трековых мембранах	46
II.3.2. Импринтинг на силикагеле	48
II.3.3. Импринтинг на диоксиде титана	53
III. Результаты и обсуждение	57
III.1. ВЭЖХ-МС/МС-определение фитостероидов в растительном экстракте	57
а) Масс-спектрометрические характеристики стандартов фитостероидов	58
б) Анализ экстракта серпухи венценосной	61
в) Определение фитостероидов в экстракте серпухи венценосной	65
г) Анализ препаратов на основе левзеи	66
д) Определение фитостероидов в препаратах левзеи	68
е) Тандемные масс-спектры фитостероидов низкого разрешения	68
III.2. Выбор систем для поверхностного импринтинга фитостероидов	73
III.2.1. Полиэлектролитный мультислой на лавсановой мембране	74
а) Контроль нанесения полиэлектролитов на мембрану	74
б) Изучение факторов, влияющих на эффективность поверхностного импринтинга	76
в) Получение отпечатков экдистена	81
III.2.2. Аминокислоты и белок на силикагеле	84

а) Получение отпечатков экидистена в слое полилейцина	84
б) Получение отпечатков экидистена в слое белка	85
• Контроль модификации силикагеля белком	85
• Сорбция экидистена на импринтированном силикагеле	86
• Групповая сорбция фитостероидов при анализе растительного экстракта	86
III.2.3. Гель TiO ₂ на наночастицах TiO ₂	88
а) Выяснение возможности получения комплекса экидистена с 3-аминофенилборной кислотой	89
б) Контроль модифицирования частиц TiO ₂ дополнительным слоем TiO ₂ и поверхностными группами	90
в) Влияние условий получения импринтированных сорбентов	96
г) Прививка дополнительных поверхностных групп	98
III.3. Твердофазная экстракция с помощью импринтированных сорбентов на основе TiO ₂	100
III.3.1. Выбор условий сорбции и десорбции экидистена	100
III.3.2. Групповая сорбция фитостероидов сорбентами на основе TiO ₂	103
а) Сорбция из экстракта серпухи венценосной	103
б) Сорбция из фармпрепаратов на основе левзеи	107
III.3.3. Сорбция фитостероидов на гидрофобизованном силикагеле	108
а) Экстракт серпухи венценосной	108
б) Фармпрепараты на основе левзеи	109
III.3.4. Применение импринтированных сорбентов при анализе растительных экстрактов методом ВЭЖХ-МС низкого разрешения	110
Выводы	117
Список литературы	119

Список сокращений

АА – акриламид

АПТЭС - (3-аминопропил)триэтоксисилан

АФБК - 3-аминофенилборная кислота

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВП – 4-винилпиридин

ГС – N-гидроксисукцинимид

ДЭДТК – диэтилдитиокарбаминат

ИАА – иодацетамид

ИЖ – ионная жидкость

ИФ – импринтинг-фактор

КНФБК - 3-карбокси-5-нитрофенилборная кислота

МАК - метакриловая кислота

МПС - (триметоксисилил)пропилметакрилат

ПААГХ – полиаллиламина гидрохлорид

ПАК – полиакриловая кислота

ПТФЭ – полиэтилентерефталат

ПЭИ - полиэтиленимин

ПЭМ – полиэлектролитные мультислои

ТБФ – трибутилфосфин

ЭДК – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид

Введение

Актуальность темы. Фитоэкдистероиды (далее – фитостероиды) являются физиологически активными компонентами многих лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе растений. Эти соединения обладают адаптогенными и антимикробными свойствами, стимулируют иммунные процессы, снижают артериальное давление, снимают спазмы и головные боли. Согласно Отраслевому стандарту Министерства здравоохранения (Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. М.: 2000), в лекарственных средствах помимо основного действующего компонента необходимо определять также и родственные ему соединения. В связи с этим разработка подхода к селективному выделению и определению группы соединений данного класса представляется актуальной.

Для идентификации фитостероидов в растительных экстрактах и фармпрепаратах чаще всего используют метод ВЭЖХ-МС (МС/МС) или ВЭЖХ-ЯМР. ЯМР-детектирование позволяет получить точную информацию о строении каждого аналита по совокупности ^1H и ^{13}C -спектров, однако в анализе растительных экстрактов применение ЯМР не всегда целесообразно, поскольку регистрация ЯМР-спектров требует выделения каждого фитостероида в миллиграммовых количествах. Для решения подобных задач целесообразнее использовать метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, который позволяет детектировать фитостероиды на уровне нанограммов без их выделения в виде отдельных фракций, а по информации о фрагментации продуктов ионизации аналитов устанавливать их строение. В этом случае информация о строении менее полна, чем в случае ЯМР, но зачастую достаточна для установления строения аналита, особенно в сочетании с литературными данными и программами обработки МС-данных. При использовании тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения можно с высокой точностью установить брутто-формулу каждого фрагмента.

В литературе описаны, в основном, масс-спектры низкого разрешения отдельных фитостероидов, а спектры высокого разрешения приводятся редко; для некоторых соединений можно найти экспериментально полученные значения точных масс ионов $[\text{M}+\text{H}]$ или $[\text{M}-\text{H}]$, однако эти данные не систематизированы. Редко указывается также, в каком режиме ионизации лучше регистрировать

соединения этого класса. Поэтому для их достоверной *идентификации* в растительном экстракте или фармпреparate необходимо более детально изучить масс-спектрометрические характеристики с применением тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Использование такого подхода позволило бы также идентифицировать фитостероиды при отсутствии стандартных образцов.

Для *определения* фитостероидов в растительных экстрактах ВЭЖХ-МС представляется наиболее подходящим методом, однако он менее распространен; чаще всего используют флуоресцентный и радиоиммунный методы детектирования. Согласно Фармакопее РФ, для анализа фармпрепаратов и биологически активных добавок в основном используют указанные методы в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией. Однако указанные виды детектирования имеют ряд ограничений, связанных с присутствием мешающих компонентов. При использовании флуоресцентного метода возможно побочное образование флуоресцирующих производных других гидроксилсодержащих соединений. Радиоиммунный анализ позволяет определять не индивидуальные соединения, а только экдизон-подобную активность. Решить эти проблемы можно при селективном извлечении группы целевых аналитов на стадии пробоподготовки образца с использованием сорбентов с молекулярными отпечатками. Использование таких сорбентов в твердофазной экстракции или препаративном разделении позволило бы сократить число стадий выделения фитостероидов из сложных матриц, в том числе из растительных экстрактов. В настоящее время для выделения фитостероидов используют длительные и многостадийные схемы, требующие больших объемов органических растворителей. Они сочетают в себе комбинации стадий препаративного хроматографического разделения на различных сорбентах (оксиде алюминия, силикагеле), позволяющие отделить примеси различной полярности от целевых соединений. Это делает выделение длительным и трудоемким, при этом потери на каждой стадии могут привести к низкому выходу выделяемых аналитов. Сорбенты с молекулярными отпечатками целевых аналитов позволили бы упростить выделение фитостероидов из сложных матриц, а также сделать его более селективным.

Целью данной работы был выбор условий идентификации и определения соединений группы фитостероидов методом тандемной масс-спектрометрии

высокого разрешения и способа селективного концентрирования этих соединений с применением молекулярного импринтинга.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Получение масс-спектрометрических характеристик соединений класса фитостероидов на примере стандартных образцов известной структуры (экдистена и туркестерона) методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения.

2. Выявление закономерностей фрагментации фитостероидов и установление характеристичных переходов, которые могут быть использованы при отнесении неизвестных соединений к этому классу.

3. Анализ экстрактов серпухи венценосной и левзеи методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, идентификация и определение в них фитостероидов в расчете на экдистен.

4. Выбор способов молекулярного импринтинга и систем «матрица – подложка» для получения молекулярных отпечатков экдистена как самого распространенного представителя класса фитостероидов. Изучение с этой целью систем «матрица – подложка» с различной конформационной жесткостью каждой из составляющих.

5. Выявление возможности групповой сорбции фитостероидов из растительных экстрактов (серпухи венценосной, левзеи) и фармпрепаратов с использованием импринтированного экдистеном носителя и оценка селективности такого извлечения. Сравнение свойств полученного импринтированного носителя со свойствами коммерчески доступного гидрофобизованного силикагеля.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1. Методы поверхностного импринтинга

Создание молекулярно-импринтированных полимеров (МИП) - перспективный способ получения систем для селективного разделения и концентрирования компонентов сложных смесей. Количество разработок в области МИП в последние годы растет из-за их способности к селективному распознаванию, простоты их синтеза, термической и химической стабильности. Эти материалы находят применение в различных областях для разделения и выделения определяемых соединений, создания химических и биохимических сенсоров, в катализе и при создании новых лекарств [1-3].

Однако при синтезе МИПов могут возникать значительные осложнения, связанные, например, с глубоким расположением и недоступностью сайтов связывания при полимеризации в массе, что препятствует последующему удалению темплата и диффузии молекулы-гостя и снижает эффективность импринтинга. Даже такие усовершенствования, как добавление порогена и измельчение материала не улучшают свойства МИПов. Возможное решение этих проблем заключается в создании МИПов, в которых основная часть сайтов связывания находилась бы на поверхности или вблизи нее [4].

I.1.1. Полиэлектролитные мультислои

Один из методов поверхностного импринтинга – получение молекулярных отпечатков в слое разноименно заряженных полиэлектролитов, нанесенных на подложку (рис. 1) [5].

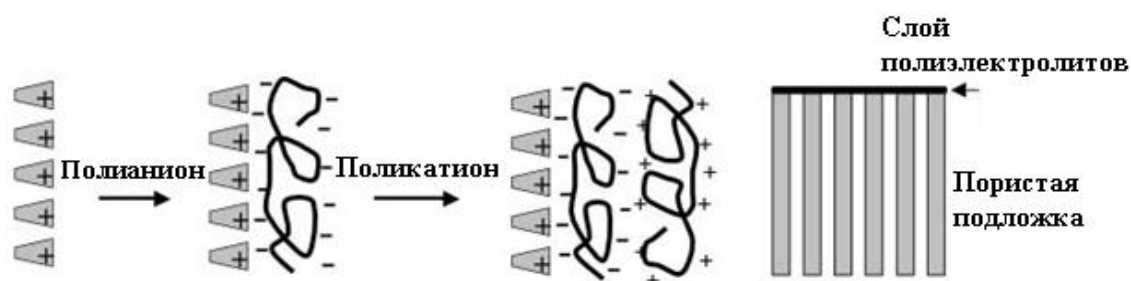


Рис. 1. Схема нанесения полиэлектролитного бислоя на пористый носитель. Повторение этой процедуры приводит к образованию многослойной пленки. Рисунок справа показывает структуру получаемых композитных мембран [5].

Пленки с нанесенными полиэлектролитными слоями особо привлекательны как мембранные материалы в связи с их широким разнообразием и легкостью нанесения слоев на мембрану. Толщина таких мембран может быть минимальной, что ускоряет массообмен. Для создания полиэлектролитных мембран могут быть использованы различные подложки и полиэлектролиты. Модификация может проходить как на сильно заряженных и полярных, так и на полимерных подложках, и ее степень зависит от размера пор подложки и ее структуры. Вещества, которые могут быть использованы при создании полиэлектролитных пленок, кроме синтетических полимеров, включают белки, нуклеиновые кислоты, алюмосиликаты, проводящие полимеры, полупроводящие наночастицы, красители и даже неорганические ионы. Такое широкое разнообразие веществ дает возможность создавать пленки с контролируемой селективностью. Вместе с тем, изменение условий нанесения слоев — pH, концентрации полимера, числа слоев, концентрации вспомогательных веществ, солей — позволяет регулировать характеристики пленки, такие как ее толщину, объемную плотность заряда и размеры пор [6].

Движущие силы при образовании полиэлектролитных пленок разнообразны, это могут быть электростатические взаимодействия, водородная и координационная связи, взаимодействия с переносом заряда и биоспецифические взаимодействия. Такие пленки широко используют в просветляющих покрытиях, биосенсорах, нелинейной оптике, твердотельных непроводящих материалах, преобразовании солнечной энергии и мембранах для разделения сложных смесей [7].

В последнее время широко распространены композитные мембраны, полученные с использованием послойных пленок на пористых поверхностях, и супрамолекулярные мембраны. Они могут быть успешно использованы для разделения одно- и двухзарядных ионов, определения компонентов морской воды и даже селективного разделения ароматических и полиароматических молекул посредством нанофильтрации или обратного осмоса [8].

Большинство послойных пленок осаждают в виде монослоев на наружной поверхности органических пористых мембран или анодного оксида алюминия. При этом в пленке образуются поры размером порядка 1 нм, малый размер таких пор сильно ограничивает поток вещества через мембрану. Есть лишь несколько

сообщений о получении пленок в порах пористых мембран, дающих возможность быстрой фильтрации [5].

Полиэлектролитные мультислои конформационно подвижны и сильно гидратированы, поэтому низкомолекулярные соединения могут диффундировать через такие слои и сорбироваться в них. В полиэлектролитные пленки могут быть включены различные виды молекул. Более того, полиэлектролитные мультислои могут быть проницаемы даже для полимеров. [1–4, 7, 8].

Установлено, что удаление темплата и распознавание определяемого соединения зависит от рН, при изменении которого возможно набухание пленки. Отмывка темплата обусловлена протонированием и перезарядкой пленки. Наличие принтованных сайтов связывания косвенно может быть подтверждено [5] сравнением изменений массы и вязкоупругости пленки с теми же показателями непринтованной системы. Большая часть темплата (тетратозилат 5,10,15,20-тетраakis-(4-(триметиламино)-фенил)-21Н,23Н-порфина) поглощается при высоких рН из-за наличия принтованных сайтов и только незначительная часть темплата связывается неспецифично в пленке.

Авторами [9] приведен пример успешного получения отпечатков теофиллина в слое полиакриловой кислоты и диазополиамина, закрепленных на поверхности частиц кремнезема. Показано, что полученные импринтированные образцы обладают высокой специфичностью по отношению к производным теофиллина. Кофеин, схожий по структуре с целевыми анализатами, удерживается хуже, что подтверждает селективность полученных сайтов связывания.

В качестве полимерной матрицы в ПЭМ может быть использован хитозан – биоразлагаемый аминополисахарид, содержащий большое число гидроксильных и амино-групп. На его основе разработаны импринтированные материалы с высокой сорбционной емкостью для извлечения перфтороктана (ИФ = 2), являющегося загрязнителем природных вод [10]. Показано, что степень сорбции целевого анализата увеличивается с ростом рН и ионной силы образца воды, а полученный импринтированный материал может повторно использоваться не менее 5 раз без потери своих свойств.

В матрице хитозана в качестве функционального полимера авторы [11] получили молекулярные отпечатки нарингина; импринтированную мембрану

использовали для извлечения целевого анализита из его водного раствора с неогесперидином, при этом максимальный процент разделения достигал 11.2%.

Импринтированный 2,4-дихлорфенолом слой хитозана успешно закрепили на частицах $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ [12], что позволило при дальнейшем их использовании с целью разложения 2,4-дихлорфенола повысить эффективность процесса до 98%.

Существует более простой, но, возможно, менее контролируемый метод модификации полиэлектролитных мультислоев - использование метал-ионных комплексов в качестве темплатов для формирования ионообменных сайтов. Например, можно закомплексовать карбоксилатные группы полиакриловой кислоты с Cu^{2+} , а затем сформировать пленку ПАК- Cu^{2+} /ПААГХ. Так как ПАК лишь частично задействована в комплексе с ионом металла, она может выступать как полианион. Последующее удаление Cu^{2+} из мембраны приводит к образованию сетки с отрицательным зарядом, и, следовательно, селективность разделения $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ увеличилась в четыре раза по сравнению с немодифицированной ПАК/ПААГХ-мембраной [5].

Для получения стабильных полиэлектролитных пленок с молекулярными отпечатками и улучшения их механических свойств используют также *ковалентную сшивку* ПЭМ. Сшивка мембраны ПАК- Cu^{2+} /ПААГХ привела к увеличению селективности. Нагревание таких пленок при 130°C (в атмосфере N_2) в течение двух часов до удаления Cu^{2+} повышает селективность разделения $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ с 55 до 610 [5].

В качестве сшивающих агентов могут выступать серная кислота, глутаровый альдегид [11, 13], возможно также использование *фото-инициированной сшивки*, например, при добавлении фоточувствительного диазополимера [4, 9]. Показано, что такой подход обеспечивает фиксацию сайтов связывания в мультислойных структурах при импринтинге порфирина в слои полиэтиленimina и полиакриловой кислоты [4], хотя селективность, а также механизмы и условия, при которых возможен такой импринтинг, требуют дальнейшего исследования и оптимизации.

Известно, что электролит определяет конформацию полимерного клубка при нанесении полиэлектролитных мультислоев, поэтому добавление электролитов (0.5–3М NaCl) при формировании полиэлектролитного мультислоя увеличивает специфичность связывания темплата и стабилизирует взаимодействия между

полимером и темплатом, что позволяет изменять проницаемость слоев полимеров [14, 15].

В качестве подложки для полиэлектролитных мультислоев удобно использовать различные проницаемые мембраны и пористые структуры [5, 7, 16-20]. Одна из таких мембран - трековая мембрана, которая представляет собой тонкую полимерную пленку с дискретными порами, полученными в результате бомбардировки тяжелыми ионами с последующим химическим травлением (рис. 2). Бомбардировка мембраны частицами вызывает появление в ней скрытых каналов, а контролируемое травление облученных зон щелочью приводит к образованию пор с определенными размерами. Изменяя условия облучения полимерной пленки и химического травления, можно получить мембраны с самыми различными размерами пор [16, 17].

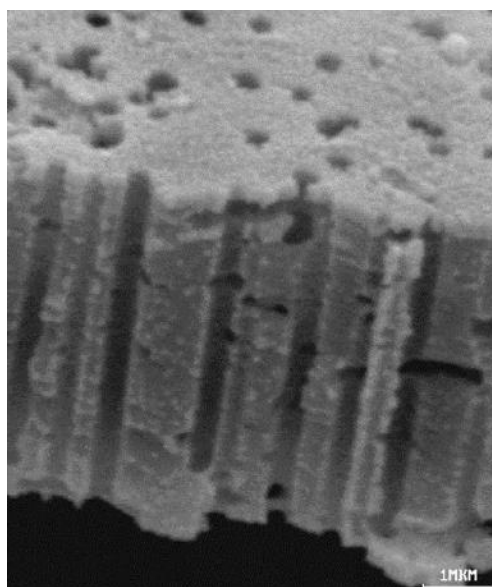


Рис. 2. Структура полиэтилентерефталатной трековой мембраны в СЭМ [17]

Часто используют трековые мембраны из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) [18]. Трековые мембраны из ПЭТФ используют для получения мембран со слоями из полимеров, причем не только заряженных: разработаны методы модифицирования поверхности трековых мембран полиэтиленгликолем, поливиниловым спиртом, поливинилпирролидоном, гепарином. Однако выяснилось, что модифицирующие слои, полученные за счет адсорбции вышеперечисленных полимеров, гидролитически неустойчивы. Для прочного связывания водорастворимых полимеров вводили бифункциональный связующий агент, способный к образованию ковалентных связей как с поверхностью

мембраны, так и с молекулами модификатора. В качестве такого бифункционального агента можно использовать полиэтиленимин — полиэлектролит, положительно заряженные аминогруппы которого способны к взаимодействию с отрицательно заряженными ионогенными группами поверхности полиэтилентерефталатной мембраны и полимеров-модификаторов. После того, как поверхность мембраны модифицирована полиэтиленимином, на нее из водного раствора можно наносить выбранные модифицирующие слои [19].

I.1.2. Молекулярно-импринтированные неорганические носители

Неорганические носители отличаются от органополимерных тем, что темплат не может проникать вглубь таких носителей и, соответственно, импринтинг с их использованием всегда бывает поверхностным. В этой главе рассмотрены способы получения молекулярных отпечатков разных типов на поверхности неорганических сорбентов на основе кремнезема, диоксида титана и оксидов железа, в том числе наноструктурированных, и применению этих материалов — в основном, в твердофазной экстракции и различных видах жидкостной хроматографии. Использование молекулярно-импринтированных материалов в качестве сорбентов в этих методах позволяет повысить селективность определения аналитов в сложных матрицах [20-24].

а) Носители на основе кремнезема

Первые работы по изучению адсорбционных свойств материалов с молекулярной памятью были проведены, очевидно, в 1930-х гг. группой Полякова именно с кремнеземом, частицы которого получали полимеризацией силиката натрия [25]. Применять сорбенты на основе кремнезема также начали на ранней стадии изучения молекулярного импринтинга. В начале 1950-х гг. Керти и коллеги показали стереоселективность импринтированного кремнезема по отношению к энантиомерам миндальной и сульфокамфорной кислот при использовании его в качестве неподвижной фазы в колоночной хроматографии [24, 26, 27]. В 1960-х гг. такие работы проводились и в Советском Союзе [28]. В конце 1970-х Сагив предложил новый способ получения импринтированного кремнезема путем адсорбции темплата на его поверхности в присутствии

октадецилтриметоксисилана, химически взаимодействующего с поверхностью SiO_2 . При этом образовывались частицы недериватизированного кремнезема с участками поверхности, комплементарными темплату [29, 30].

Дальнейшее развитие методов контроля морфологии поверхности частиц при импринтинге привело к разработке самых разных подходов в этой области. Мосбах впервые модифицировал поверхность частиц кремнезема метакриловыми группами, к которым был привит комплекс темплат–мономер [31]. Темплатом служил белок – рибонуклеаза А, за счет металл-координационных связей образующая комплекс с металл-хелатным мономером – N-(4-винил)-бензилиминодиуксусной кислотой и ионами меди(II). Применение таких однородных по размеру частиц в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ позволяло достичь приемлемого потока через хроматографическую колонку по сравнению с осколочными частицами нерегулярного размера, получаемыми после измельчения монолитного импринтированного материала.

Благодаря своей стабильности, подходящим физическим свойствам и простоте дериватизации кремнезем стал наиболее часто используемым материалом при получении частиц ядро-оболочка (core-shell). При использовании таких частиц в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ было показано, что они быстро связывают аналит благодаря эффективной диффузии. К тому же сферические частицы регулярного размера лучше подходят для набивания колонок, чем осколочные.

Известны несколько вариантов прививки импринтированного слоя на поверхность частиц кремнезема. В ранних работах кремнезем модифицировали винильными группами, а дальнейшее добавление к нему полимеризационной смеси (мономер, темплат, сшиватель и инициатор) приводило к формированию слоя импринтированного полимера вокруг частиц [24, 32–35]. Однако наряду с образованием полимерной оболочки возможен побочный процесс полимеризации в массе; сложность также состоит в контроле толщины образующегося на кремнеземе импринтированного слоя. Для преодоления этих недостатков Селлерген [36] предложил использовать ковалентную модификацию поверхности кремнезема азоинициатором. Ограничив присутствие иницирующих радикалов только твердым носителем при отсутствии свободных переносчиков цепи в растворе, возможно удлинить цепь полимера преимущественно на частицах

кремнезема с минимальной долей полимеризации в растворе и получить очень тонкий слой импринтированного полимера – толщиной около 0.8 нм.

Описано применение частиц, полученных таким способом, в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ при определении гербицидов. При этом показана не только селективность сорбента по отношению к темплату – пропазину (импринтинг-фактор (ИФ) равен 6), но и к родственными соединениям (импринтинг-факторы от 0.4 до 4.2), при этом времена удерживания значительно различаются, что позволяет разделить хроматографически их смеси [37].

Улучшение формы хроматографических пиков при использовании в качестве сорбента частиц кремнезема, импринтированных путем полимеризации с привитым инициатором, показано на примере ВЭЖХ-анализа смеси девяти бета-блокаторов [38]. Характеристики методики сравнимы с таковыми для МИП, полученных полимеризацией в суспензии в виде сферических частиц. Отмечено, что на поверхности частиц полимер присутствует лишь в малой степени; значительная его часть находится в порах.

Разработан особый вид инициаторов – инифертеры (iniferter: INItiator – transFERagent – TERminator), которые в ходе реакции образуют два типа радикалов: одни иницируют полимеризацию, другие – переносят радикальный центр и обрывают цепь путем рекомбинации [39–42]. Модифицирование поверхности частиц инифертерами позволяет осуществлять полимеризацию только в месте иммобилизации этих групп на поверхности частиц, при этом полностью исключается полимеризация в растворе. Пример использования такого метода рассмотрен [41] при получении отпечатков сульфаметазина. При анализе смеси родственных соединений селективность полученного таким способом импринтированного сорбента по отношению к аналиту выше, чем для неимпринтированного (фактор разделения сульфаметазина и родственных соединений составил 1.7, ИФ = 1.56). Импринтированный сорбент позволяет хроматографически разделить эти соединения. Предел обнаружения составил 25 нг/мл, что позволило определять 8 нг/мл сульфаметазина в молоке после концентрирования.

Описана [42] возможность применения частиц, синтезированных при использовании иммобилизованного инифертера, в качестве сорбента для ВЭЖХ. Полученные колонки обладали большим числом теоретических тарелок по

сравнению с колонками на основе частиц ядро-оболочка, однако при определении тиабендазола – противогрибкового средства, используемого при хранении фруктов и овощей – воспроизводимость времен удерживания и площадей пиков была ниже. Предел обнаружения тиабендазола составил 0.03 мг/мл, что позволяет проводить анализ реальных объектов.

Можно иммобилизовать и сам темплат, при этом образование слоя импринтированного полимера внутри пористой структуры кремнезема и последующее растворение SiO_2 приводит к образованию частиц полимера с такой же структурой пор, как у используемых частиц кремнезема, причем с отпечатками темплата на своей поверхности. Таким образом, в данном варианте кремнезем позволяет контролировать морфологию молекулярно-импринтированного полимера. Такой подход был применен Мосбахом [43]: за счет образования амидных связей внутренняя поверхность пор частиц кремнезема с аминпропильными группами была модифицирована темплатом (производным теофиллина). Далее к модифицированному темплатом кремнезему добавляли смесь функционального мономера (трифторметилакриловой кислоты) и сшивателя (дивинилбензола). После завершения полимеризации кремнезем растворяли в HF, формируя тем самым сайты селективного связывания на поверхности оставшегося полимера. Достоинство такого метода – формирование полимерных частиц с узким распределением пор по размерам. Кроме того, в этом подходе можно не иммобилизовать темплат, как в классическом варианте импринтинга, а использовать кремнезем лишь как шаблон для создания пористой структуры получаемых полимерных частиц [44].

Показана возможность импринтинга белка, основанного на предварительной иммобилизации темплата в порах кремнезема [45]. Это вариант ранее предложенного импринтинга эпитопов, при котором в качестве темплата используют короткий пептид, содержащий аминокислотную последовательность целевого белка – будущего анализата [46]. Такой пептид предварительно получали стандартными методами твердофазного синтеза на поверхности кремнезема, затем поры кремнезема заполняли смесью мономера и сшивателя (метакриловая кислота и этиленгликольдиметакрилат) и инициатора, а после полимеризации растворяли кремнезем с помощью гидрофторида аммония NH_4HF_2 . Полученный

импринтированный материал селективен по отношению не только к целевому белку, но и к другим пептидам, структурно подобным темплату [45].

Оболочку на кремнеземе можно также создать нанесением готового полимера. В качестве полимера в работе [47] использовали предварительно синтезированную так называемую полиамидовую кислоту (рис. 3), которая прочно удерживается на различных поверхностях. Частицы кремнезема предварительно химически модифицировали для иммобилизации аминогрупп, улучшающих адгезию полимерной пленки. ВЭЖХ-анализ на полученном сорбенте показал его способность селективно распознавать аналит (эстрон, ИФ = 1.8) по сравнению с его структурными аналогами (ИФ от 0.67 до 1.07). Фактор селективности рассчитывали как отношение соответствующих импринтинг-факторов. Достигнуто хроматографическое разделение аналита и тестостерона. Интересно, что при синтезе в качестве темплата использовали производное эстрогена для получения сорбента, селективного к самому эстрогену.

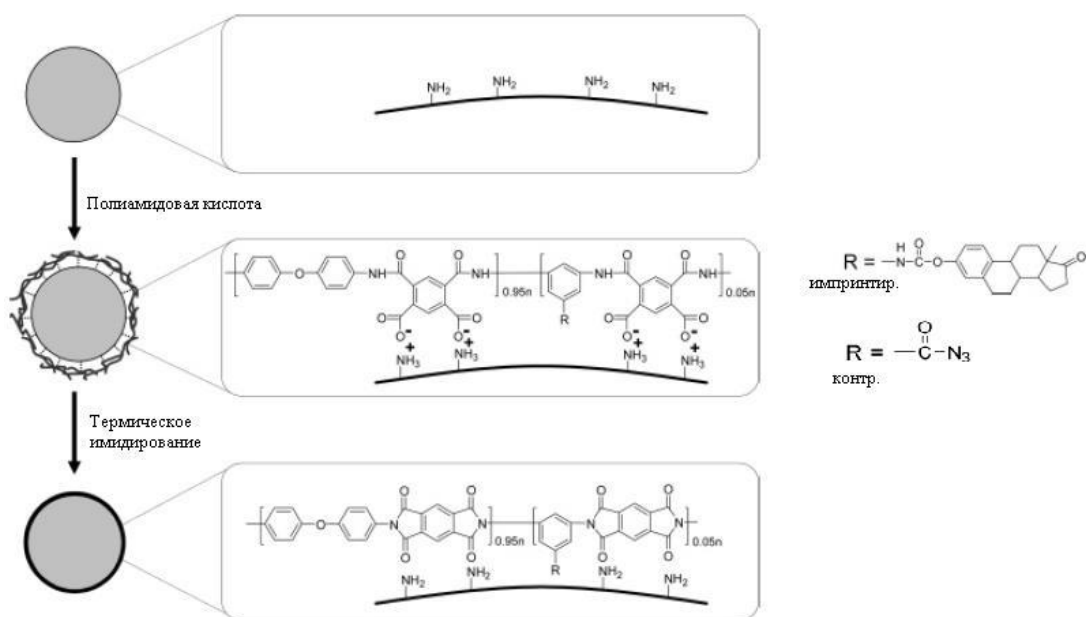


Рис. 3. Модифицирование частиц кремнезема полиамидовой кислотой (polyamic acid) [47], полученной в предварительном синтезе с использованием эстронового эфира 3,5-диаминофенилкарбаминовой кислоты (для импринтированного полимера) или 3,5-диаминобензоилазида (для контрольного полимера).

Еще один подход к получению импринтированных наночастиц кремнезема - синтез импринтированных частиц кремнезема золь-гель методом при гидролизе органосиланов, часто тетраэтоксисилана (TEOS), без использования готовых частиц SiO₂ [48, 49]. В работе [48] данный метод сочетали с предварительным получением комплекса эстрогена (темплата) с 3-(триэтоксисил)-

пропилизотианатом (мономером). При этом между указанными двумя соединениями образуются уретановые связи, которые позже термически разрушают для удаления темплата после синтеза. Для получения отпечатков на поверхности синтезируемых частиц в реакционную смесь сначала добавляют TEOS, а затем предполимеризационный комплекс. Полученный материал обладает селективностью по отношению к эстрону по сравнению с его структурным аналогом – пропионатом тестостерона.

Золь-гель метод позволяет также создавать органическо-неорганические гибридные пленки [50], т.е. варьировать состав матрицы: кремний-органические мономеры сочетают с неорганическим прекурсором. Сочетание различных мономеров позволяет внедрить разные функциональные группы в жесткую неорганическую матрицу и таким образом контролировать специфичность и селективность полученного материала посредством взаимного дополнения неорганической и органической частей матрицы по конформационной подвижности. Можно сравнить такой подход с иммобилизацией белка на неорганической подложке [51], что использовали для жесткого фиксирования молекулы фермента, увеличивающего не только стабильность, но также активность его центров и селективность протекающей в них реакции.

Импринтированный кремнезем находит широкое применение не только в качестве неподвижной фазы в ВЭЖХ, но и в твердофазной экстракции (МИП-ТФЭ). Использование МИП-ТФЭ при пробоподготовке образцов позволяет уменьшить фоновый сигнал и мешающее влияние сопутствующих компонентов, улучшить разделение пиков на хроматограмме, уменьшить предел обнаружения и сделать возможным обнаружение следов [52–54].

Твердофазная экстракция на импринтированном сорбенте включает те же стадии, что и обычная ТФЭ (кондиционирование сорбента, пропускание образца, промывка и элюирование), но имеет ряд особенностей. На стадии сорбции важную роль играет природа растворителя. Обычно, если анализируемый образец растворен в малополярном растворителе, сорбция селективна, т.е. компоненты матрицы не удерживаются. Если же анализируют водный раствор, аналит и мешающие компоненты неспецифично удерживаются на сорбенте (в основном за счет водородных связей), поэтому для достижения селективной сорбции необходима промывка органическим растворителем перед стадией элюирования.

Для повышения коэффициента разделения необходимо использовать небольшие объемы элюента, однако взаимодействие аналита с импринтированным сорбентом иногда настолько сильно, что необходимо увеличивать объем элюента. Чтобы избежать этого, используют смесь органических растворителей или органического растворителя с водой, а также добавляют такие активные растворители, как уксусная кислота или пиридин [55].

Как и обычная твердофазная экстракция, МИП-ТФЭ возможна в режимах онлайн (МИП-сорбент в предколонке в хроматографической системе) и оффлайн (использование МИП-ТФЭ-картриджей при пробоподготовке). Однако большинство публикаций посвящено именно оффлайн-способу, причем не только из-за простоты оборудования, но и благодаря возможности использовать различные условия при элюировании, в том числе и жесткие (органические растворители, кислоты, щелочи и др.) без необходимости подстраиваться под хроматографическую систему. Именно оффлайн вариант МИП-ТФЭ чаще всего применяют для реальных объектов.

В онлайн-варианте МИП-ТФЭ импринтированный сорбент в картридже из нержавеющей стали помещают в петлю на клапане ввода в хроматограф. Преимущество такого режима по сравнению с оффлайн-режимом заключается в отсутствии манипуляций с образцом во время предварительного концентрирования и анализа. Снижается риск потерь и внесения мешающих компонентов, уменьшается предел обнаружения и улучшается воспроизводимость. При этом прямой ввод пробы в аналитическую систему после картриджа позволяет уменьшить ее объем и тем самым снизить расход органических растворителей и сделать возможной автоматизацию [55].

Подобный онлайн метод реализован при определении триазиновых гербицидов в водном растворе, моче и экстракте яблок. Образцы предварительно пропускали через предколонку с октадецилкремнеземом, после чего аналиты с мешающими компонентами попадали на МИП-предколонку. После промывки аналиты элюировали подвижной фазой на аналитическую колонку [56].

Онлайн-концентрирование на МИП-носителе позволило понизить предел обнаружения инсулина в крови и моче до 0.2 и 0.03 нг/мл, соответственно, а также автоматизировать анализ за счет совмещения МИП-картриджа и хроматографической системы [57]. Аналогичный сорбент и картридж для онлайн

МИП-ТФЭ разработан для определения декстрометорфана в плазме крови, предел обнаружения – 0.12 нг/мл [58].

Использование МИП-ТФЭ также возможно в режиме "импульсного элюирования" (англ. "pulsed elution"). Такой метод (МИП-ТФЭ-ИЭ) реализуют при элюировании аналита малым объемом растворителя с колонки с МИП-сорбентом, напрямую подключенной к системе детектирования. В работе [59] приведен пример успешного использования такого подхода к определению теофиллина в крови. При этом предварительно выбирают подходящую подвижную фазу, обеспечивающую удерживание теофиллина на МИП-сорбенте. Затем вводом 20 мкл протонного полярного растворителя аналит элюируют и проводят прямое УФ-детектирование. Таким образом возможно концентрирование из большого объема разбавленного образца, благодаря чему снижается предел обнаружения. По сравнению с существующими ВЭЖХ-методиками, МИП-ТФЭ-ИЭ при мониторинге теофиллина в плазме дает сравнимый предел обнаружения, выигрыш во времени анализа, не требует проведения ферментативной пробоподготовки и более дешев [60].

Этот метод позволил также снизить предел обнаружения охратоксина А до 5 нг/мл, полное время анализа составило 5 мин. Импринтированные аналитом частицы синтезировали на основе N-фенилакриламида и упаковывали в микроколонки для дальнейшей ТФЭ [61].

Недостатком МИП-ТФЭ, как и трудностью в использовании всех остальных импринтированных материалов, является сложность в полном удалении темплата после синтеза, т.к. даже после длительной отмывки остаточное количество темплата все же остается в материале [55]. Проблема усугубляется тем, что при синтезе используют количества темплата на уровне миллиграммов, а образец для последующего анализа зачастую содержит аналит на уровне микро- или нанограммов. Избежать ложных результатов при анализе в этом случае можно при использовании в качестве темплата не самого аналита, а его структурного аналога ("dummy template"). При таком подходе остаточное количество темплата легко отличить от аналита при последующем анализе.

Использование аналогов темплатов получило широкое распространение. Один из первых примеров такого рода – получение МИП-ТФЭ-сорбента, при котором вместо самеридина применили его структурный аналог, содержащий

метильную группу вместо этильной [62]. Этот же подход реализован в работах [63, 64], в которых показана возможность применения дибутилмеламин и триалкилмеламинов в качестве темплатов-аналогов для синтеза МИП на гербицид атразин. Аналогичный подход описан и для селективной твердофазной экстракции 4-аминопиридина на основе сорбента, импринтированного 2-аминопиридином [65]. Для определения бисфенола А синтезирован сорбент на основе пористых наночастиц МСМ-48. В качестве темплата (структурного аналога аналита) использовали тетрабромбисфенол А. При использовании полученного материала для МИП-ТФЭ перед ВЭЖХ-анализом предел обнаружения аналита составил 3 нг/мл [66]. Вместо структурного аналога можно использовать в качестве темплата аналит, меченный радиоактивным изотопом [67], что показано также на примере бисфенола А. При ВЭЖХ-анализе образцов речной воды предел обнаружения целевого аналита снижается до 1 мкг/л, если используют предварительную МИП-ТФЭ.

б) Магнитные частицы

Еще одно направление в области создания поверхностно-импринтированных сорбентов на основе неорганических частиц - использование частиц магнетита Fe_3O_4 в качестве ядер. Частицы имеют нанометровый размер и высокую магнитную восприимчивость. Отмечается их преимущество при пробоподготовке для извлечения и концентрирования аналитов из сложных матриц (рис. 4), т.к. разделение можно осуществить в одну стадию с помощью магнита, без центрифугирования или фильтрации.

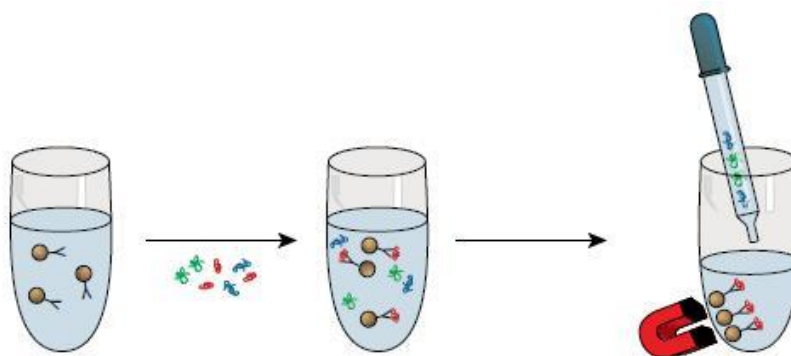


Рис. 4. Схема выделения и концентрирования аналита с использованием магнитных частиц.

Покрытие магнитных частиц оболочкой кремнезема позволяет в дальнейшем получать широкий спектр функциональных групп на поверхности, как и при использовании частиц SiO_2 [68-71]. Обычно для этого на магнетите создают слой инертного кремнезема, т.к. он обладает сродством к оксидам железа, предохраняет магнитные частицы от агрегации и улучшает их химическую стабильность. Метод силанизации предложен Вайтхедом в 1985 г. Магнитные частицы непосредственно покрывали силанизирующими связующими, что обеспечивало высокую плотность привитых групп и простоту методики. Для получения функциональных групп под определенный анализ формируют оболочку, например, из аминопропилтриэтоксисилана (APTES) или тетраэтоксисилана (TEOS). Органосиланы – бифункциональные молекулы, включающие триалкокси- или трихлорсилановые группы, которые используют для ковалентного модифицирования поверхности функциональными группами, например, $-\text{O}_3\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ [68, 69, 72].

Описан ряд примеров создания слоя SiO_2 на магнетите золь-гель методом с использованием тетраэтоксисилана (TEOS). При импринтинге пестицида атразина изучены [68] как структура и морфология полученных частиц, так и их аналитические свойства при использовании в пробоподготовке для дальнейшего ВЭЖХ-анализа. Показана селективность магнитного сорбента по отношению к атразину для импринтированных и неимпринтированных частиц, а также в присутствии его структурных аналогов – цианазина и меламина. Импринтинг фактор составил 1.7. Площадь хроматографического пика линейно зависит от концентрации атразина (для его модельных растворов после пробоподготовки с использованием исследуемого сорбента) в интервале концентраций 0.1–2.0 мкг/мл, предел обнаружения составил 0.005 мкг/мл. Однако для анализа реальных объектов, как отмечают авторы, необходима доработка метода.

Описано получение импринтированных магнитных микросфер для последующего создания пьезокварцевого сенсора на сосудосуживающее вещество фенилэфрин [69]. Импринтинг осуществляли в одну стадию добавлением к Fe_3O_4 двух мономеров: TEOS и аминопропилтриметоксисилана (APTMS). При этом TEOS был взят в избытке (80%) и отвечал за образование гидрофобных связей Si–O–Si, а APTMS обеспечивал наличие аминогрупп для взаимодействия с темплатом. Отмечается необходимость предварительной обработки микросфер HCl для

лучшего связывания Fe_3O_4 и кремниевых мономеров, иначе в результате синтеза образуется смесь неимпринтированных магнитных и SiO_2 -микросфер. Авторы обращают внимание на то, что на поверхности импринтированных микросфер заряд поверхностных ОН-групп при низких рН близок к нейтральному, что позволяет избежать электростатического отталкивания темплата от сорбента. Измерение магнитного насыщения сорбента показало высокое содержание магнетита в микросферах $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$. Установлена высокая селективность пьезокварцевого сенсора (с модифицированной импринтированными частицами поверхностью) к фенилэфрину по сравнению с еще несколькими структурно схожими соединениями (коэффициент селективности, определяемый как отношение количеств связываемого фенилэфрина и конкурирующего соединения, был равен 4 вместо обычных 2–3 для других импринтированных слоев, описанных в более ранних работах), а предел обнаружения составил $1 \cdot 10^{-7}$ М. Такие характеристики, по мнению авторов, позволят применять данный метод для разделения и определения различных соединений.

Возможна и более сложная схема создания магнитных частиц ядро-оболочка. На первой стадии с помощью TEOS и органосиланов (APTES, APTMS) формируют SiO_2 -оболочку с NH_2 -группами. После обработки 2-бромизобутирилбромидом образуются частицы $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{Br}$, которые далее используют в качестве инициатора для поверхностно-инициированной радикальной полимеризации с переносом атома (atomtransferradicalpolymerization, ATRP). Пример такого синтеза реализован в работе [73] для получения молекулярных отпечатков мезилата пefлоксацина – антибактериального средства широкого профиля, определение которого требуется, например, в молоке и мясе. К поверхностно-закрепленному инициатору $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{Br}$ добавляли смесь темплата, мономеров (метакриловая кислота и 2-гидроксиэтилметакрилат) и сшивателя (этиленгликольдиметакрилат) в присутствии N,N,N',N'',N'' -пентаметилдиэтилентриамина и CuBr . Полученные импринтированные частицы показали высокую селективность при распознавании целевого анализита по сравнению с тремя соединениями сходной структуры. Импринтинг фактор равен 6.3. Сложность в поиске подхода к импринтингу данного соединения состояла в том, что пefлоксацин – низкомолекулярное водорастворимое соединение, нерастворимое в апротонных слабополярных органических растворителях, Создать МИП для

рассматриваемого соединения стало возможным с применением АТРР, в которой возможно использование высокополярных растворителей, таких как ДМФА, вода и метанол.

Эффективность применения магнитных импринтированных частиц при пробоподготовке перед ВЭЖХ-анализом показана на примере определения триазинов в почве, соевых бобах, салате и пшене [74]. Экстракционная емкость импринтированного сорбента по сравнению с неимпринтированным была в 5 раз выше. Обнаружено, что названный сорбент извлекает группу семи родственных триазинов. Последующий ВЭЖХ-анализ образцов показал эффективность пробоподготовки с разработанным сорбентом: удалось добиться разделения пиков смеси триазинов и сделать их определение в реальных объектах более селективным. Фоновый сигнал на хроматограммах экстрактов стал таким же малоинтенсивным, как и для модельных растворов соединений в чистом растворителе. Зависимость площади хроматографического пика атразина от концентрации была линейной в интервале 5–50 мкг/л, пределы обнаружения триазинов составили от 2 до 8 мкг/л.

Благодаря использованию нагрева микроволновым излучением при синтезе магнетита удалось получить частицы с очень узким распределением по размерам (диаметр 80 – 250 нм). Затем частицы стабилизировали полиэтиленгликолем (ПЭГ) в присутствии поливинилового спирта и олеиновой кислоты, после чего суспензию магнитных частиц вводили в смесь темплата, сшивателя, мономеров и инициатора. Иницированная микроволновым излучением полимеризация приводила к образованию частиц, структура которых представлена на рис. 5.

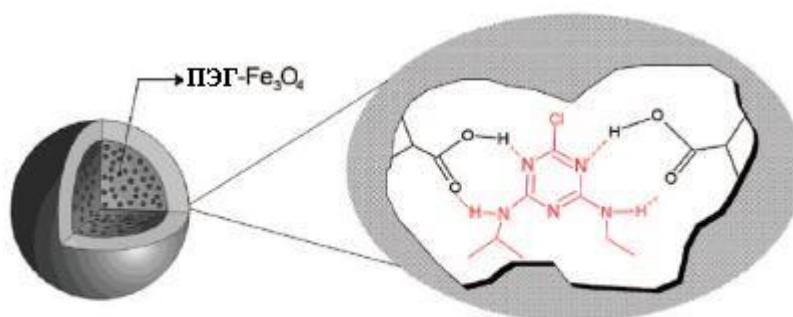


Рис. 5. Импринтированные атразином магнитные частицы ядро–оболочка [74].

Авторы отмечают, что частицы магнетита играют двойную роль: формируют магнитное ядро частиц, а также увеличивают поглощение микроволновых волн при полимеризации, повышая ее эффективность.

Известны примеры создания сложных композитных сорбентов на основе магнитных частиц. Разработан сорбент для МИП-ТФЭ для определения бисфенола А [75]. Основой для частиц ядро-оболочка служил наномагнетит, который покрывали слоем SiO_2 и затем импринтированным полимером (рис. 6). Для избежания попадания остаточных количеств темплата в образец при анализе в качестве темплата использовали структурный аналог бисфенола А – бисфенол F. При последующем анализе воды с использованием МИП-ТФЭ предел обнаружения бисфенола А составил 2.5 пг/мл.

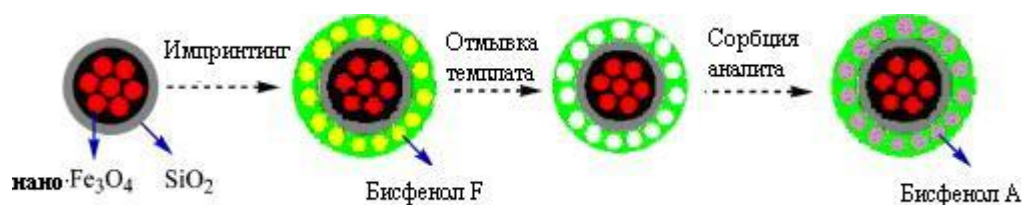


Рис. 6. Получение МИП–ТФЭ сорбента на основе магнитных частиц для определения бисфенола А [75].

Для одновременного извлечения из воды ионов тяжелых металлов (Cd^{2+}) и органических загрязнителей (2,4-дихлорфенол) разработан метод синтеза магнитных кадмий-импринтированных частиц на основе Fe_3O_4 , TiO_2 и хитозана [76]. Интересно, что молекулярные отпечатки получали в матрице хитозана, на котором также закрепляли частицы магнетита и оксида титана(IV). При этом ионы кадмия сорбировались за счет импринтированного слоя, а 2,4-дихлорфенол извлекался за счет сорбции с последующей фотодеструкцией (УФ-облучение) в присутствии катализатора – частиц TiO_2 . Полученный композитный сорбент обладал высокой сорбционной емкостью по отношению к Cd^{2+} (250 мг/г), а эффективность фоторазложения 10 мг/л 2,4-дихлорфенола достигала 98%.

Создан подход к получению композитных сорбентов для быстрого выделения аналита с помощью двухслойных полимерных микрочастиц, импринтированных (R, S)-пропранололом, и магнитных частиц $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, меченных азидом. Поверхность импринтированных полимерных частиц модифицировали магнитными частицами с помощью катализируемой ионами Cu(I)

реакции циклоприсоединения азидо-групп, привитых на магнитных частицах, по тройной связи, находящейся на поверхности импринтированных частиц ("click chemistry"). Полученные частицы селективно связывают аналит, а также обладают магнитными свойствами, что позволяет просто и быстро их отделять [77].

Примеров применения магнитных частиц в молекулярном импринтинге пока меньше, чем сорбентов на основе SiO_2 . МИП-магнетит используют для селективной твердофазной экстракции (ТФЭ) при пробоподготовке образцов для ВЭЖХ, требующих предварительного отделения аналита (или группы аналитов) от сложной матрицы. Описаны также методы стабилизации и инкапсулирования магнитных частиц, пока не нашедшие применения для получения молекулярных отпечатков, но позволяющие эффективно модифицировать поверхность Fe_3O_4 различными функциональными группами. К биосовместимым оболочкам относят декстран, хитозан, желатин, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и т.д. Среди них ПЭГ является типичным нетоксичным, неиммуногенным, протеин-устойчивым полимером. Такое покрытие повышает совместимость наночастиц и водной среды и защищает их поверхность от окисления. В некоторых работах описывается одностадийный метод нанесения ПЭГ на Fe_3O_4 [78] за счет ван-дер-ваальсовых и водородных сил, однако эти связи недостаточно прочны для предотвращения агрегации частиц. Улучшить свойства ПЭГ-покрытия можно, если сначала привить на частицы аминопропилсилановые группы, а затем ковалентно связать с ними полиэтиленгликоль с двумя карбокси-группами (НООС-ПЭГ-СООН). Дикарбоксильный ПЭГ закрепляется на поверхности за счет по крайней мере одной карбоксильной группы, при этом вторая может участвовать в дальнейших химических превращениях. На морфологию и покрывающую способность дикарбоксильного ПЭГ, а также свойства получаемых магнитных частиц сильно влияет молекулярная масса этого модификатора [79].

Распространены также методы модификации магнетита, основанные на послойном нанесении поверхностно-активных веществ (ПАВ). Наиболее широко применяют катионные ПАВ – цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ), цетилпиридиния хлорид, а также анионы длинноцепочечных жирных кислот [80–82]. Выявлено, что частицы наномангнетита, модифицированного олеиновой и меркаптопропионовой кислотами, обеспечивают высокую степень извлечения из воды ионов меди(II) и свинца(II) в широком диапазоне pH. Мангнетит,

модифицированный ЦТАБ, сорбирует 80-90% фенолов, что позволяет использовать его для концентрирования этих загрязнителей [81].

Показано [83], что возможно получение магнетита (размер частиц – 10 нм), покрытого полиаллиламином (ПАА), обработкой им частиц Fe_3O_4 , стабилизированных диэтаноломином в присутствии диэтиленгликоля. Частицы Fe_3O_4 -ПАА диспергированы в водном растворе в виде небольших кластеров по 2–5 частиц. Они образуют значительно более устойчивый коллоидный раствор по сравнению с немодифицированным магнетитом, что авторы связывают именно с заменой стабилизирующих лигандов (диэтаноломина и диэтиленгликоля) на ПАА.

Описано [84] получение наночастиц Fe_3O_4 (13 нм), модифицированных полиакриловой кислотой (ПАК) путем карбодиимидной пришивки ее к магнетиту. В среднем на одной магнитной частице закрепляется две молекулы ПАК. Такой материал способен быстро и эффективно сорбировать и десорбировать аналиты (например, лизоцим в течение 1 мин), что делает данный сорбент перспективным для разработки сорбционных материалов, в том числе и молекулярно-импринтированных.

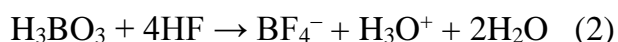
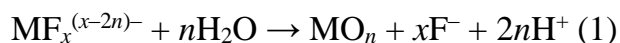
Карбодиимидной сшивкой, описанной выше, авторы модифицировали Fe_3O_4 хитозаном [85] – натуральным полисахаридом, гидрофильным, биосовместимым и биоразлагаемым, и к тому же обладающим сродством ко многим биомакромолекулам. Отмечается, что хитозан способен также адсорбировать ряд ионов металлов, благодаря участию его аминогрупп в образовании комплексов. Полученные частицы (размер – 13.5 нм) эффективно сорбируют ионы Cu(II) , равновесие достигается в течение 1 мин.

в) Носители на основе оксида титана(IV)

Неорганические материалы привлекательны для применения в молекулярном импринтинге благодаря жесткой структуре матрицы. Одно из соединений, на основе которых получены молекулярно-импринтированные носители, – оксид титана(IV). Селективные сорбенты, пригодные для использования на практике, на его основе пока не созданы, но есть ряд работ, показывающих такую возможность в дальнейшем.

В работах, посвященных молекулярному импринтингу, часто получают тонкие пленки оксидов, используя при этом как физические (вакуумное испарение

и напыление), так и химические методы (химическое осаждение из паровой фазы, золь-гель методы, электроосаждение). Для органических темплатов желательно использовать процессы в растворе как не требующие повышенных температур и жестких условий. Нанесение из раствора (liquid-phase deposition, LPD) позволяет создавать слой оксида металла на различных поверхностях, погруженных в водный раствор [86]. В основе одного из вариантов метода LPD лежат следующие реакции [87]:



Первая реакция – гидролиз фторидного комплекса металла, приводящий к образованию оксида. Это равновесие может быть сдвинуто вправо добавлением борной кислоты, образующей стабильный комплекс с F^- (реакция 2). В результате тонкий слой оксида покрывает поверхность, при этом не требуется специального оборудования.

Разработан сенсор для определения пепсина с чувствительным слоем на основе импринтированного пепсином TiO_2 [82]. Оксид титана(IV) осаждали на стеклянные пластинки, покрытые слоем золота, из раствора $(\text{NH}_4)_2\text{TiF}_6$. Для лучшего закрепления белка при импринтинге в смесь исходных реагентов для LPD добавляли готовый полимер – поли-L-лизин, без которого отпечаток белка в слое TiO_2 получить не удастся. Константа связывания пепсина была высокой ($7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$).

Нанесение из раствора использовали для покрытия квантовых точек импринтированным слоем оксида титана(IV) [87]. Точки далее использовали для определения рибонуклеазы А и других белков. Показано, что специфическое связывание аналита протекает полнее, если при синтезе темплат ковалентно закреплен на квантовых точках.

Поверхностным импринтингом на TiO_2 повышали селективность этого сорбента как катализатора в фотокаталитической реакции разложения фенольных соединений, являющихся загрязнителями окружающей среды, за счет повышения их адсорбции [88].

Работы группы Кунитакэ посвящены поверхностному импринтингу в слое оксида титана(IV), нанесенного золь-гель методом на разные носители (частицы

оксидов, пьезокварцевые резонаторы и т. д.) [89–92]. Общая схема поверхностного золь-гель нанесения приведена на рис. 7. Показано, например, что при импринтинге глюкозы полученный слой селективен к ней за счет сайтов связывания, способных различить молекулы с различным расположением гидроксильных групп [89]. Селективность реализуется за счет пространственного расположения минимум пяти Ti-OH-групп, взаимодействующих с темплатом. Авторы отмечают структурную многофункциональность и универсальность оксида титана(IV) для дальнейшего использования для других темплатов.

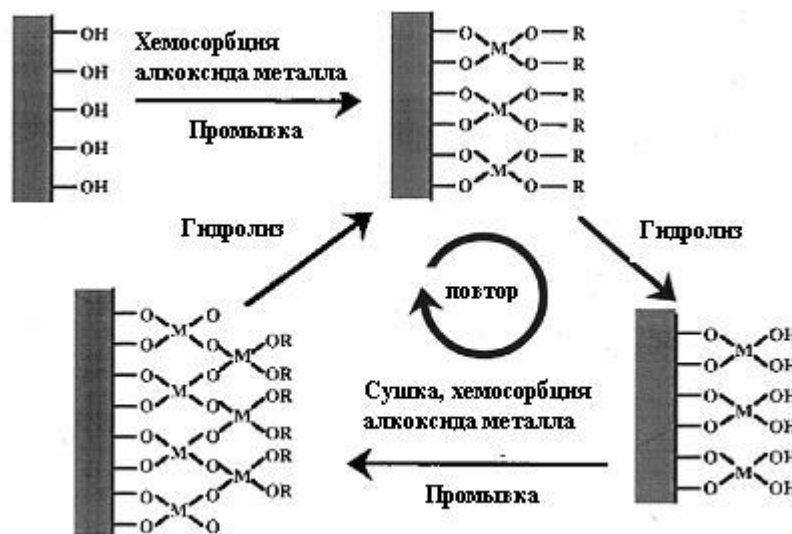


Рис. 7. Нанесение слоя оксида металла на поверхность носителя золь-гель методом [92].

При создании сенсора для определения хлорароматических кислот обнаружено, что на стадии полимеризации диоксид титана образует вокруг молекулы темплата жесткий каркас, поддерживаемый водородными связями между Ti-OH-группами и карбоксильными группами темплатов. Авторы отмечают, что именно жесткость матрицы позволила зафиксировать в ней контуры молекулы темплата, что и обеспечило селективность полученных тонких пленок. Оценено количество сайтов связывания в получаемом материале: $1.2 \cdot 10^{19}$ / г [88]. Импринтинг карбоксилсодержащих азосоединений удобно проводить золь-гель методом на оксиде титана(IV), поскольку такой метод не требует высокой температуры (в отличие от нанесения из паровой фазы) и, таким образом, подходит для импринтинга термически неустойчивых соединений [91].

Преимущества таких слоев при импринтинге – их малая толщина (около 1 нм) и возможность использования алкоксида любого металла, способного взаимодействовать с поверхностными гидроксильными группами подложки (алюминия, циркония, ниобия и др.) [92]. Возможно также встраивание в матрицу наносимого оксида слоев органических веществ и полимеров для образования гибридных слоев (например, в оксид титана(IV) вводили полиакриловую кислоту [92]), что перспективно для создания новых молекулярно-импринтированных сорбентов.

Авторы [93] отмечают перспективность использования золь-гель метода при создании неорганических импринтированных материалов вследствие целого ряда достоинств, в том числе возможности использования мягких условий и их варьирования для получения необходимой пористости и площади поверхности материала.

* * *

Таким образом, молекулярный импринтинг – эффективный способ выделения и концентрирования аналитов (в том числе групп родственных соединений) из матриц сложного состава. Перспективно получение молекулярных отпечатков на поверхности частиц или мембран, поскольку при этом удается решить проблемы, связанные с труднодоступностью сайтов связывания. По литературным данным, импринтинг аналитов различной природы наиболее воспроизводим при использовании таких матриц, как акриловые мономеры, кремнезем и диоксид титана(IV). Примеры успешного получения и использования импринтинга в эти матрицы описаны в большом числе работ, что позволяет брать их за основу при разработке подхода к молекулярному импринтингу фитостероидов.

I.2 Методы определения фитостероидов

Фитостероиды используют в качестве компонентов биологически активных добавок, а также в косметических и дерматологических средствах [94]. Они обладают адаптогенными и иммуностимулирующими свойствами (что используют, на пример, для ВИЧ-больных), помогают эффективно снизить давление крови.

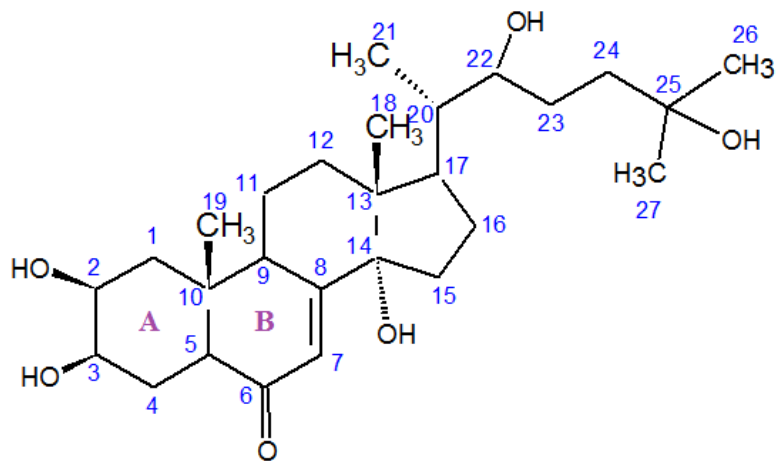


Рис. 8. Структурная формула экдизона [94].

Фитоэкдистероиды (далее в работе - фитостероиды) представляют собой большое семейство полигидроксильных стероидов (более 300 веществ) – структурных производных экдизона [94–96] (рис. 8). При этом изменение числа и положения атомов углерода и гидроксильных заместителей объясняют сильно различающиеся полярности представителей этого класса соединений. Соединения этого класса имеют следующие общие характеристики: (1) наличие хромофорной группы 7-ен-6-он (с максимумом поглощения при 242–243 нм для метанольного раствора); (2) атом водорода в 5β-положении (цис-соединение колец А/В); (3) наличие нескольких гидроксильных групп, которое делает эти соединения достаточно водорастворимыми [97].

Широкое разнообразие фитостероидов, присутствующих в растительных экстрактах, ставит задачу их селективного выделения и определения. Известно около ста семейств растений, содержащих фитостероиды: шпинат (*Spinaciaoleracea L.*) [98, 99], лебеда (*Chenopodium quinoa*) [99], род *Potamogeton* [100], род левзея (*Leusea*) [101], род *Silene* [102, 103], род серпуха (*Serratula*) [104].

Содержание фитостероидов в растениях составляет от 50 нг/г до 30 мг/г сухой массы (т.е. до 3% масс.). Растения содержат большое число очень схожих по строению минорных фитостероидов в небольших концентрациях и один или несколько доминантных, чаще всего им бывает экдистен (20-гидроксиэкдизон; 20HE; 20E; 2β,3β,14α,20R,22R,25-гексагидрокси-5β-холест-7-ен-6-он) [97].

а) Тонкослойная хроматография

Нормальнофазовую ТСХ на силикагелях широко применяют для разделения и определения экистероидов. Несмотря на широкое распространение ВЭЖХ, низкие затраты, простота и скорость выполнения ТСХ обуславливают применение этого метода при исследованиях экистероидов [94, 97]. Для ТСХ экидизона и подобных ему соединений применяют различные растворители, указанные в табл. 1 [94].

Таблица 1. Системы растворителей, используемые в ТСХ экистероидов (Е – экидизон, 20Е – экистен) на силикагеле [94]

Растворитель	Соотношение компонентов (об./об.)	R _f	
		Е	20Е
CHCl ₃ / 95 % EtOH	7 : 3	0.39	0.34
CHCl ₃ / MeOH	9 : 1	0.10	0.07
CHCl ₃ / Pr-1-OH	9 : 5	0.21	0.12
CH ₂ Cl ₂ / Me ₂ CO / MeOH	2 : 1 : 1	0.69	0.62
CH ₂ Cl ₂ / Me ₂ CO / EtOH	16 : 4 : 5	0.32	0.10
CH ₂ Cl ₂ / MeOH / H ₂ O	79 : 15 : 1	0.32	0.19
CH ₂ Cl ₂ / MeOH / 25 % NH ₃ – H ₂ O / H ₂ O	77 : 20 : 2 : 1	0.47	0.40
EtOAc / EtOH	4 : 1	0.49	0.46

Возможно использование и обращенно-фазовой ТСХ на кремнеземах с привитыми алкильными группами (от 2 до 18 атомов углерода) [94]. Элюентами служат смеси метанол – вода, этанол – вода, изопропанол – вода, ацетонитрил – вода и ацетон – вода, при этом первую применяют чаще. Увеличение содержания метанола в элюенте повышает значения R_f экидизона и экистена, при этом наблюдается почти линейная зависимость R_f от содержания метанола (рис. 9).

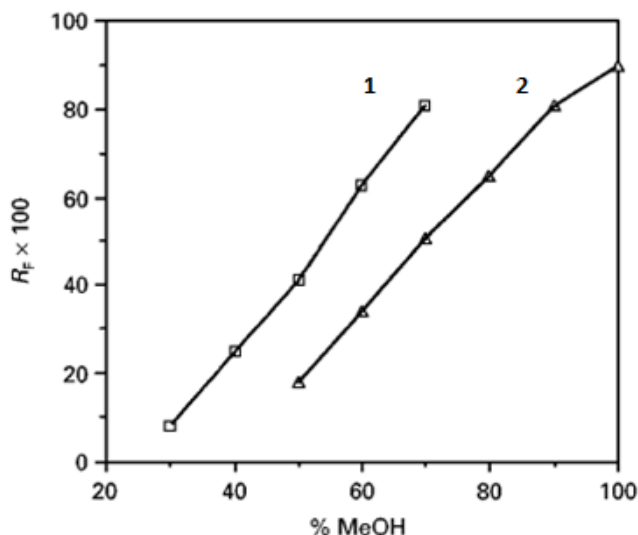


Рис. 9. Влияние состава элюирующей смеси метанол – вода на R_f экдизона (1) и экдистена (2) в методе обращеннофазовой ТСХ на кремнеземе с привитыми С18-группами.

Детектирование в ТСХ. Детектирование экдистероидов на пластинках ТСХ может быть выполнено с использованием различных подходов с разной селективностью (табл. 2 [94, 97]). Неспецифичными являются окрашивание параами иода, нагревание в присутствии карбоната аммония (флуоресцентное свечение пятен) или тушение флуоресценции при наличии внедренного в сорбент флуоресцирующего агента. Более специфичные реагенты, такие как ванилин с серной кислотой, могут быть использованы для получения характерной окраски пятен. Серная кислота или карбонат аммония также дают флуоресцентную реакцию.

Таблица 2. Методы визуального обнаружения экдистероидов в ТСХ

Метод	Описание
УФ-поглощение	Визуальное определение под УФ-светом (малочувствительный метод)
Тушение флуоресценции	Пластинки для ТСХ на основе кремнезема с люминесцентным агентом (ZnSe)
Неспецифичные цветные реакции	<ol style="list-style-type: none"> 1. Пары I_2 2. Фосфорновольфрамовая кислота (синее окрашивание) 3. Анисовый альдегид
Флуоресценция	<ol style="list-style-type: none"> 1. H_2SO_4 2. $(NH_4)_2CO_3$

Реагент на основе ванилина	Опрыскивание смесью ванилин / 95 % EtOH / H ₂ SO ₄ (5:70:25, масс./об./об.), затем нагревание до 100–120 °С в течение 10 мин
Реакции на 3-оксоэкдистероиды	<ol style="list-style-type: none"> 1. Метод Лоури (Фолина-Чикальтеу) – синее окрашивание 2. 2,4-Динитрофенилгидразин – желтое окрашивание (+ K₃Fe(CN)₆ дает оранжевый цвет) 3. Хлористый трифенилтетразолий – красное окрашивание
Измерение радиоактивности	Сканирование или ауторадиография
Масс-спектрометрия	Масс-спектрометрия с DART (Direct Analysis in Real Time – прямой анализ в реальном времени)

б) Высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография

Для определения фитостероидов в основном используют хроматографические методы. Применение *газовой хроматографии* имеет ограничения из-за необходимости дериватизации аналитов, что зачастую бывает сложным [94, 105]. Для повышения летучести аналитов получают их триметилсилильные и ацильные производные, однако полученные дериватизаты крайне чувствительны к присутствию следов воды, что затрудняет их получение и дальнейшую работу с ними.

В настоящее время наиболее широко используют методы высокоэффективной *жидкостной* (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ), при этом основной для аналитических целей является первая [94, 100, 103–111]. Именно для разделения и определения фитостероидов были использованы обращенно-фазовая (ОФ) и нормально-фазовая (НФ) ВЭЖХ использовали несколько различных подвижных фаз в каждом методе [103]. При использовании НФ-ВЭЖХ было установлено, что присутствие следов воды в подвижной фазе значительно повышало эффективность разделения аналитов. При этом пики на хроматограмме становились симметричными и возрастало их разрешение. Однако, в то же время, большинство использованных неподвижных фаз на основе

кремнезема накапливало воду из подвижной фазы. При этом значения времен удерживания аналитов постепенно изменялись от одного ввода пробы к другому. Исключением была неподвижная фаза ZorbaxSil, сдвиг времен на которой не наблюдался за счет ее устойчивости к накоплению воды. При последующем анализе образцов методом ОФ-ВЭЖХ получали дополнительные данные, и таким образом в результате использования различных подвижных и неподвижных фаз все исследуемые фитостероиды были идентифицированы.

Нормально-фазовая ВЭЖХ. В нормально-фазовой ВЭЖХ чаще всего используют колонки с кремнеземами (иногда также с привитыми полярными группами) и смеси состава дихлорметан – изопропанол – вода в качестве подвижной фазы. Неполярные экистероиды (например, в виде эфиров) могут быть разделены смесью с соотношением указанных растворителей 125 : 15 : 1 (об.), среднеполярные аналиты (экизон, экистен) – 125 : 30 : 2, наиболее полярные (26-гидроксиэкистероиды и гликозиды) – 125 : 40 : 3 или 100 : 40 : 3. Дихлорметан сильно поглощает в УФ области, в связи с чем не подходит для УФ-детектирования после ВЭЖХ. Такая проблема не возникает при использовании смесей на основе циклогексана, однако экистероиды не всегда достаточно в нем растворимы, из-за чего возникают проблемы при определении и препаративном разделении полярных аналитов [94].

Также могут быть использованы колонки с привитыми на кремнезем полярными группами (диол, полиол, аминопропилсилан). Достоинство такого вида сорбентов – возможность использования градиентного элюирования, в то время как в кремнеземных колонках могут возникнуть сложности при использовании такого режима из-за длительности установления равновесного состояния сорбента при смене состава подвижной фазы колонки [94].

Обращенно-фазовая ВЭЖХ. В этом методе чаще всего используют сорбент с привитыми C₁₈-группами в сочетании со смесями вода – метанол в качестве элюента [94, 108, 109]. Наиболее эффективны, особенно для разделения полярных конъюгатов и/или разделения в присутствии экизоновых кислот, смеси вода – ацетонитрил. Возможно также варьирование рН элюента, при этом изменяются времена удерживания полярных экистероидов. Более того, метод ОФ ВЭЖХ позволяет получить значения рK_a ионизирующихся групп исследуемых соединений.

Детектирование фитостероидов. УФ-детектирование подходит для определения производных экдизона на уровне 10 пмоль из-за наличия у них хромофорной группы 7-ен-6-он ($\lambda_{\text{max}} = 242$ нм). Диодные УФ-детекторы позволяют получить информацию о спектрах поглощения всех элюируемых пиков, при этом для этого требуется содержание компонента менее чем 100 нг.

Для флуоресцентного детектирования фитостероидов требуется получение флуоресцирующих производных, что понижает предел их обнаружения до 10 пг [110]. В качестве реагентов используют фенантренборную кислоту (специфичную по отношению к α -диолам; экдистероиды являются 20,22-диолами), а также 1-антроилнитрил, реагирующий со спиртами (в экдистероидах это группа 2-ОН). Однако названные реакции неспецифичны на экдистероиды и поэтому не получили широкого распространения.

Детектирование по радиоактивной метке позволяет легко выявить соответствие между пиками соединений с меткой и немеченого стандарта, внесенного в пробу перед анализом. Такой подход используется в метаболомных исследованиях.

ЯМР-спектроскопия также может быть использована в режиме онлайн для идентификации экдистероидов. Такой метод используют только при анализе растительных экстрактов, так как в них содержание аналитов достаточно высокое. Один из недостатков – необходимость использовать относительно дорогие дейтерированные растворители [101, 104, 108, 109, 111].

Один из самых чувствительных методов определения экдистероидов – радиоиммунный (предел обнаружения – 1 нг), однако он позволяет определить экдизон-подобную активность, но не индивидуальные соединения [105, 106], поэтому используется только для решения отдельных задач. Как метод детектирования после ВЭЖХ, РИА используют для выявления наличия в растениях класса фитостероидов, расчета общего их содержания в растительном сырье [102] и распределения по самому растению (листья, стебли, корни и т.д.) [93]. Авторы [99] показали, что УФ-детектирование (при 254 нм) не всегда позволяет определить весь класс фитостероидов, т.е. является недостаточно универсальным, поэтому был разработан комплексный подход: РИА-детектирование с последующим дополнительным определением биологической активности гидролизатов экстрактов растений.

Описано определение фитостероидов на уровне нанограммов при масс-спектрометрическом детектировании (ВЭЖХ-МС или МС/МС) [94, 106, 107, 110]. Одно из главных достоинств этого метода – отсутствие необходимости дериватизации аналитов. Наиболее интенсивные пики в масс-спектрах несвязанных фитостероидов при мягкой ионизации (например, термоспрей или химическая ионизация при атмосферном давлении) соответствуют ионам $[M + H]^+$, $[M + H - H_2O]^+$ и $[M + H - 2H_2O]^+$, а при ионизации электроспреем – ионам аддуктов целевых аналитов с Na (из подвижной фазы) $[M + Na]^+$ [101]. Сообщается, что предел обнаружения фитостероидов при ионизации термоспреем находятся на уровне нанограммов, а при использовании химической ионизации при атмосферном давлении пределы обнаружения экдизона и экдистена составляют 10 и 100 пг, соответственно [107].

Определению данного класса соединений, прежде всего минорных (например, макистеронов), методом ВЭЖХ могут мешать компоненты матрицы растительного экстракта, например, флавоноиды, иридоиды, полипидин В [96, 106, 110].

В работе [105] сравнивают РИА и МС-детектирование, показано преимущество использования масс-спектрометрии (выше чувствительность и селективность) при определении отдельных фитостероидов, а не класса в целом. Для определения трех целевых аналитов авторами разработан метод ВЭЖХ-МС, основанный на их детектировании в режиме сканирования выбранных ионов (SIM – selected ion monitoring). Такой подход позволил не только значительно более селективно определять исследуемые соединения, но и повысить чувствительность их определения в растительных экстрактах в 2–10 раз по сравнению с ВЭЖХ-РИА анализом тех же образцов. Описаны масс-спектры экдизона, экдистена и макистерона А, полученные с помощью химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) в режиме сканирования положительных ионов (рис. 10), выбраны характеристичные ионы, используемые в дальнейшем для идентификации аналитов в реальных объектах. В ряду достоинств разработанного подхода авторы отмечают его независимость от потенциально возможного слабого связывания фитостероида с антителом, как в методе ВЭЖХ-РИА, что позволяет определять меньшие количества аналитов в растительном экстракте.

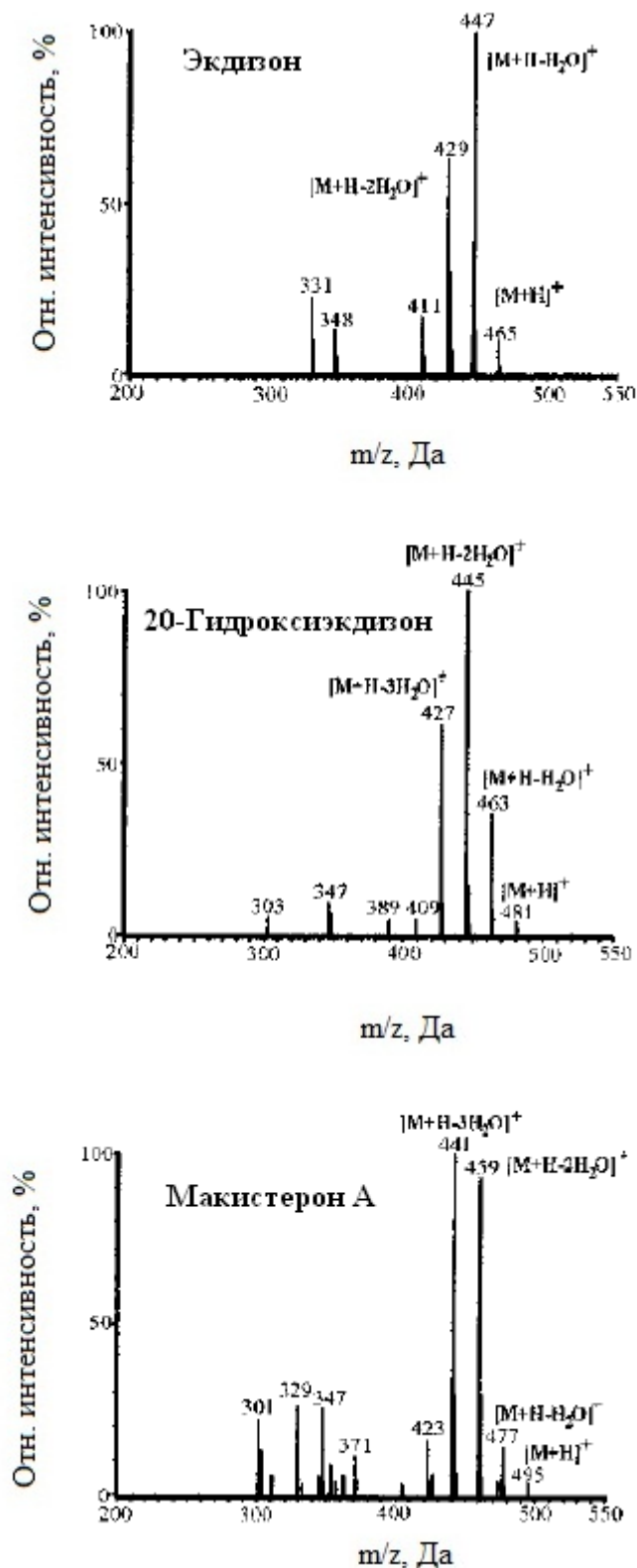


Рис. 10. Масс-спектры экдизона, 20-гидроксиэкдизона (экдистена) и макистерона А, полученные при химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) в режиме сканирования положительных ионов [105].

Способ повышения селективности определения фитостероидов основан на использовании их взаимодействия с борными кислотами за счет наличия в их структуре диольных групп. Такие подходы реализованы при использовании

сорбентов (ВЭЖХ, ТФЭ) [112-114] с привитыми борными кислотами, при получении соответствующих производных аналитов перед хроматографированием [115–119], а также при использовании элюентов с добавлением борных кислот [120]. На рис. 11 приведена схема образования комплекса экдистена с арилборной кислотой [117].

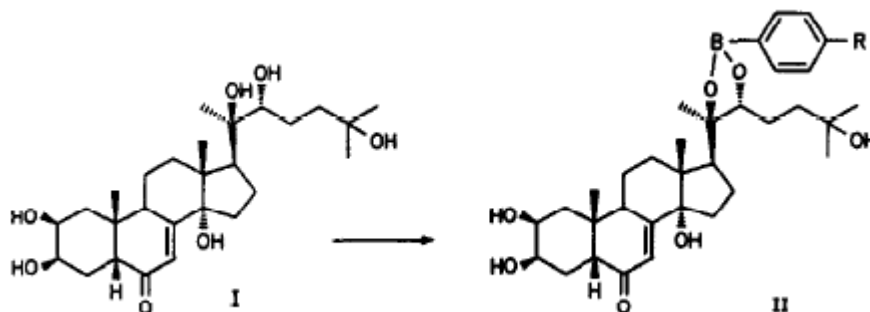


Рис. 11. Структура экдистена (I) и его комплекса с арилборной кислотой (II) [117].

При определении фитостероидов в сложных матрицах использование сорбентов с иммобилизованными борными кислотами дает ряд преимуществ вследствие того, что позволяет легко избавиться от неудерживаемых компонентов, а также повторно использовать реагент (борную кислоту), однако необходимо наличие мягкого метода десорбции удерживаемых аналитов (не разрушающего как гидроксидные группы, так и сами фитостероиды) [117].

Фенилборонаты фитостероидов могут быть получены в различных растворителях, а для разрушения образующегося комплекса используют диолы, гидроксил- и дикарбоновые кислоты, однако окислительное расщепление связи С–В пероксидом водорода дает наилучший результат [115, 117, 119].

Авторы [117] отмечают, что получение таких производных позволяет использовать обычную обращенно-фазовую ТФЭ для их извлечения из сложных матриц с использованием растворителей с более высокой элюирующей способностью, чем при определении свободных фитостероидов, что позволяет более эффективно удалять полярные мешающие компоненты. В этой работе указывается, что использование таких дериватирующих агентов ограничено наличием в структуре аналита ОН-групп в положениях 20 и 22, необходимых для образования комплекса. По ОН-группам в положениях 2 и 3 фенилборные кислоты не образуют комплекс с фитостероидами [115], что ограничивает круг идентифицируемых аналитов.

в) Идентификация и подтверждение структуры фитостероидов

Один из ключевых моментов при исследовании фитостероидного профиля растительных экстрактов – определение структуры определяемых аналитов и подтверждение того, что данное соединение является новым или одним из уже известных. Для решения этой задачи широко используют метод ЯМР, который при сочетании спектров ^1H и ^{13}C дает однозначную информацию о структуре целевых соединений [94, 101, 102, 108–110]. Предварительно с использованием препаративной ВЭЖХ экстракт разделяют на фракции, содержащие отдельно каждый интересующий аналит. Так как для информативного ЯМР-спектра необходимо довольно большое количество вещества (несколько миллиграммов), то отдельные фракции собирают несколько раз (накапливают) и концентрируют до получения необходимого количества вещества.

В литературе описано много схем выделения фитостероидов. Общая схема состоит в получении первоначального неочищенного экстракта (чаще всего метанольного) и последующего удаления из него липофильных и гидрофильных примесей методом жидкость-жидкостной экстракции, а также осаждения полярных мешающих компонентов с использованием ацетона [96, 111] (схема 1). Для подготовки полученного экстракта к препаративному разделению целевых аналитов используют несколько хроматографических стадий очистки: сначала колоночная хроматография низкого давления с использованием оксида кремния или оксида алюминия в качестве неподвижной фазы (несколько стадий с различным соотношением сорбент / экстракт) и затем противоточная хроматография [111].

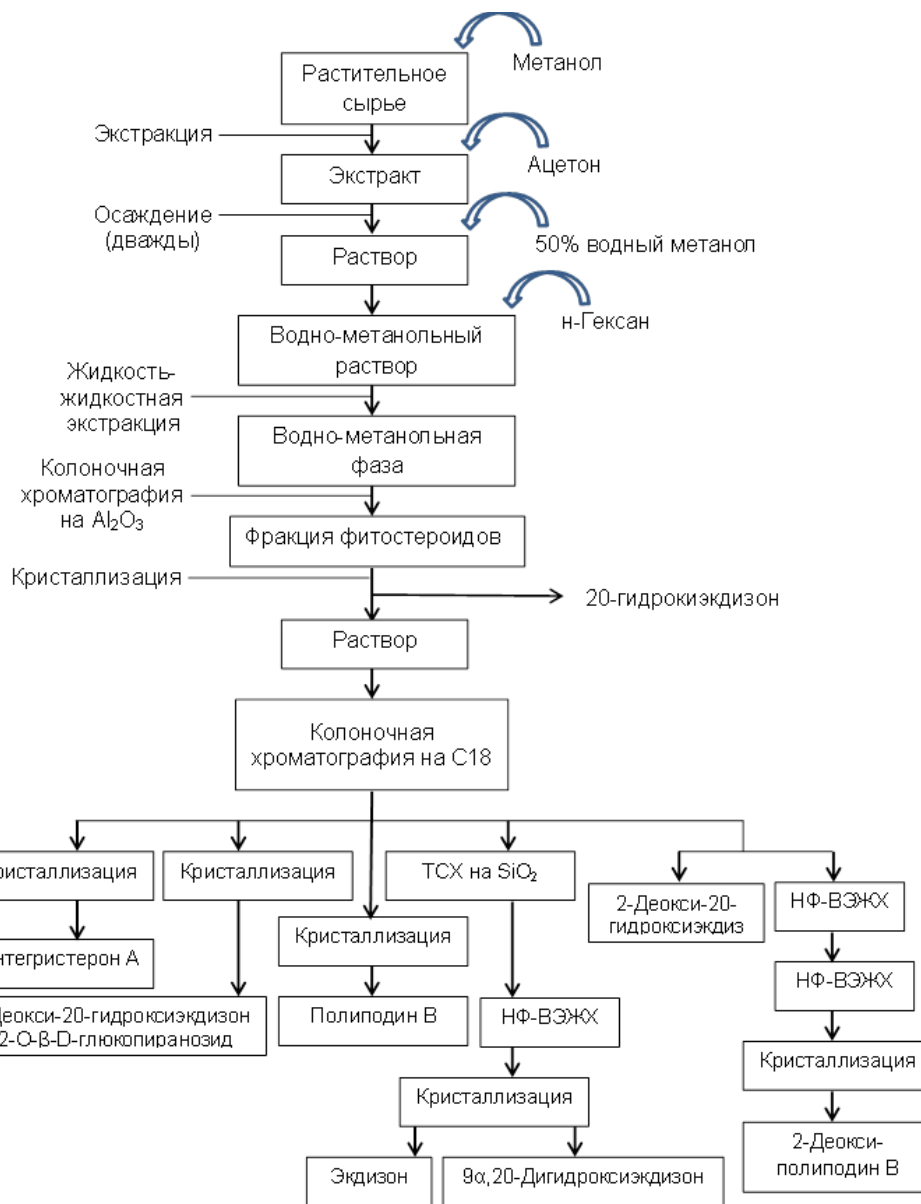


Схема 1. Выделение фитостероидов из растительного экстракта [96].

Последующее использование препаративной ВЭЖХ [94, 99, 102, 109] позволяет получить целевые компоненты достаточной степени чистоты, необходимой для установления их структуры, например, методом ЯМР. Химические сдвиги сигналов протонов экдизона, 20-гидроксиэкдизона и некоторых других фитостероидов описаны в литературе [101, 111] и позволяют однозначно идентифицировать найденные соединения.

Для исследования структуры новых фитостероидов регистрируют их ^1H -спектры в дейтерированных растворителях, для чего необходимо выделить несколько десятков микрограммов чистых веществ. Однозначное определение структуры неизвестных соединений возможно с использованием двумерных 2D- ^1H -

спектров, а также ^{13}C -спектров, для получения которых необходимо уже до нескольких миллиграммов вещества [111].

Проводить идентификацию целевых аналитов удобно с использованием тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения, позволяющей определять характерную фрагментацию соединений и получать экспериментальные значения m/z с точностью до 5 ppm по отношению к теоретической (рис. 12), что дает возможность с высокой точностью рассчитывать их брутто-формулы [101, 121].

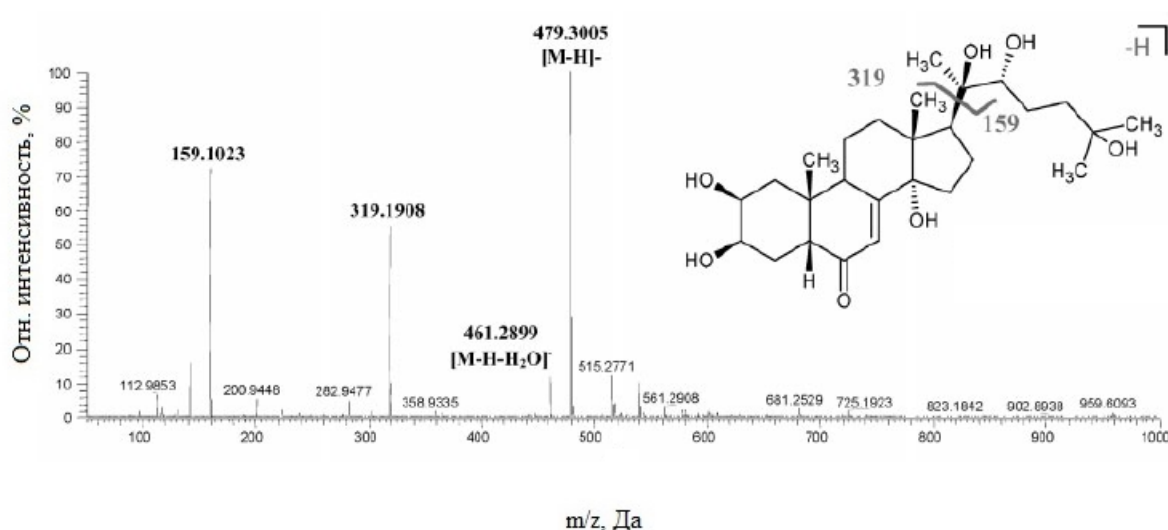


Рис 12. Масс-спектр экидистена ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения (ионизация электроспреем, режим регистрации отрицательных ионов) и предположительная схема фрагментации [121]

* * *

Выделение активных компонентов из растительного сырья является важной задачей, при этом оно длительно и трудоемко. В связи с этим актуальна разработка материалов и сорбентов, которые позволяли бы относительно селективно выделять целевые соединения для решения препаративных и аналитических задач. В качестве исследуемой группы веществ нами был выбран класс фитостероидов, содержащихся во многих растениях, в частности в серпухе венценосной и левзее сафлоровидной.

Основная задача работы заключалась в выборе подходящей системы для молекулярного импринтинга, позволяющей получить стабильные молекулярные отпечатки экидистена, как одного из главных представителей рассматриваемого класса соединений. Анализ литературных данных показал, что для соединений средней молекулярной массы наиболее перспективно получение молекулярных

отпечатков на поверхности. При проведении поверхностного импринтинга важен выбор матрицы сорбента. Алгоритма, позволяющего однозначно выбрать наилучшую матрицу для конкретного аналита или класса веществ, не существует. Описанные в литературе матрицы сорбентов, используемых в молекулярном импринтинге, имеют различную природу; в частности, слои полиэлектролитов или белков и неорганические оксиды отличаются между собой по конформационной жесткости трехмерной сетки атомов, окружающей молекулу темплата и сохраняющей отпечаток после его удаления [8, 50, 51, 90]. Перечисленные матрицы для поверхностного импринтинга обычно наносят на подложки, поверхность которых служит основой для импринтированного слоя. Подложками могут быть полимерные мембраны [9, 16-18] или твердые частицы [20-92].

В данной работе мы изменяли конформационную жесткость матрицы для импринтинга: начав с самой простой и одновременно наиболее гибкой матрицы (слой полиэлектролита), мы перешли к слою белка и затем к наиболее конформационно жесткой матрице – гелю диоксида титана. При этом мы использовали различные подложки (трековые мембраны, силикагель и наночастицы диоксида титана).

Для детектирования фитостероидов наиболее подходящий метод – высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. При определении этих соединений в таких сложных объектах, как растительные экстракты, перспективна идентификация не отдельного аналита, а класса соединений (групповая идентификация), которая позволила бы обойтись без использования стандартных образцов каждого из целевых аналитов. Для соединений группы фитостероидов такой подход ранее не применяли, поэтому первый этап работы был посвящен выбору условий идентификации фитостероидов методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения.

II. Экспериментальная часть

II.1. Реактивы и оборудование

Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду, очищенную на установке «Миллипор» (Франция), с удельной электропроводностью не более $18.2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}^{-1}$ и 95%-й этанол (медицинский, ОАО «Ферейн»). Использовали пенициллин V (кислота) Sigma, гидрохлорид полиаллиламина (ПААГХ, средняя молекулярная масса 58 кДа) и полиакриловую кислоту (ПАК, средняя молекулярная масса 450 кДа) Aldrich, ионную жидкость – тетрафторборат бутилметилимидазолия [BMIm][BF₄] (ИЖ) Fluka. Готовили 0.01 М растворы полиэлектролитов (в расчете на мономер): ПАК (95%-м этаноле) и ПААГХ (в 95%-м этаноле с добавкой 5 об.% воды).

В качестве темплата для получения молекулярных отпечатков использовали экдистен (стандартный образец с содержанием целевого вещества >93%, Sigma–Aldrich, кат. № 5289-74-7). При изучении масс-спектрометрических характеристик фитостероидов использовали также туркестерон (стандартный образец с содержанием целевого вещества >98.5%, ООО «Фитопанацея», кат. № 41451-87-0). В качестве подложки применяли силикагель с привитыми группами иминодиуксусной кислоты («Диасорб SiO₂-ИДК», фракция 100–200 мкм), на котором закрепляли бычий сывороточный альбумин (БСА, Mw ~ 68 000 г/моль, AppliChem). Для активирования карбоксильных групп SiO₂-ИДК использовали N-гидроксисукцинимид (ГС, Mw = 115.09 г/моль, Sigma–Aldrich) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (ЭДК, Mw = 155.24 г/моль, Sigma–Aldrich). Для последующего дезактивирования непрореагировавших групп ГС на поверхности силикагеля добавляли рассчитанное количество диэтаноламина (ч.д.а., Люмэкс) в виде раствора в ДМСО.

При денатурировании белка в качестве восстанавливающего реагента применяли трибутилфосфин (ТБФ, Sigma–Aldrich; виала содержит готовый для использования 200 мМ раствор реагента в 1-метил-2-пирролидоне), а в качестве алкилирующего –иодацетамид (ИАА, Mw = 184.96 г/моль, Sigma–Aldrich), 0.5 М раствор которого получали растворением навески в деионизованной воде непосредственно перед экспериментом. Для дальнейшей ковалентной пришивки БСА к силикагелю денатурированный белок очищали от избытка реагентов с

использованием наконечников, наполненных сорбентом, HyperSep Tip (Thermo). При нековалентном закреплении белка такой очистки белка не требовалось.

Для поликонденсации лейцина использовали лейцин (Sigma–Aldrich), пентафторфенол ($M_w = 184.07$ г/моль, Sigma–Aldrich), а также полиэтиленимин (50% водный раствор, $M_w = 60000 / 750000$, Sigma–Aldrich).

Использовали диоксид титана (Sigma–Aldrich, нанопорошок со средним диаметром частиц 21 нм), толуол (Acros Organics, для ВЭЖХ, 99.99%), этанол (Merck, 99.9%), гидроксид калия (ч.д.а.), гидрохлорид 3-аминофенилборной кислоты (Aldrich, 98%), буюксид титана(IV) (Aldrich, 97%), ацетонитрил (Sharlau, для градиентной ВЭЖХ) и муравьиную кислоту (Acros Organics, 98%).

Для измерения pH буферных растворов использовали pH-метр Seven-Multi (Mettler Toledo). Непрерывное перемешивание образцов при синтезе осуществляли на шейкере MS-3-digital (IKA), который помещали в термостат либо холодильник для поддержания необходимой температуры. Перемешивали полученные материалы при отмывке и изучении сорбционных свойств с использованием ротационного миксера Multi RS-60 (Biosan).

Для получения ИК-спектров образцов TiO_2 в таблетках KBr использовали ИК-спектрометр Varian 680-IR.

Микрофотографии TiO_2 получали в просвечивающем электронном микроскопе LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss,).

Хроматографическое определение целевых аналитов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС на хроматографе Dionex Ultimate 3000 с термостатируемой колонкой (HypersilGold aQ, $150 \times 2,1$ мм, размер зерна 3 мкм, Thermo) и масс-спектрометром Thermo QExactive высокого разрешения, оснащенный источником ионизации электрораспылением при атмосферном давлении.

Исследования методом нормально-фазовой ВЭЖХ проводили на хроматографе с УФ-детектором Dionex Ultimate 3000 с термостатируемой колонкой (Waters Viridis Silica 4.6×150 мм, размер зерна 5 мкм).

Для приготовления экстракта серпухи венценосной (*Serratula coronata*, Архангельская область, время сбора июль - август) использовали надземные части (стебли и листья) растения.

Использовали следующие фармацевтические препараты на основе левзеи: «Левзея П» (ООО «Парафарм», г. Пенза. Состав: порошок корневищ с корнями левзеи, аскорбиновая кислота, вспомогательные компоненты: лактоза, метилцеллюлоза, стеарат кальция, тальк, твин 80, диоксид титана, краситель E122), «Левзеи экстракт жидкий (для приема внутрь)» (ООО «Камелия НПП», г. Лобня, Московская область. Состав: для приготовления 1000 мл препарата необходимо: рапontiкума сафлоровидного корневищ с корнями – 1000 г, спирт этиловый (этанол) 70% - достаточное количество для получения 1 л экстракта).

II.2. ВЭЖХ-МС/МС определение фитостероидов

Методика (1). В работе использовали два элюента: А – смесь ацетонитрил – вода (5 / 95 об.) с добавкой 0.1% (об.) HCOOH; В – ацетонитрил с добавкой 0.1% (об.) HCOOH. Разделение проводили в режиме градиентного элюирования: 0 – 1 мин: 10% В; 1 – 9 мин: 10 – 90% В; 9 – 12 мин: 90% В; 12 – 12.5 мин: 90 – 10% В; 12.5 – 15 мин: 10% В. Объем вводимой пробы составлял 3 мкл. Температура термостата колонки: 30°C, скорость подачи элюента: 0.5 мл/мин. Измерения проводили в режиме регистрации отрицательных ионов по полному ионному току в диапазоне масс 100.00 – 1000.00 Да с разрешением 35000. Температура в камере ионизации: 320°C, напряжение на капилляре: 4 кВ. Масс-спектры второго порядка получали высокоэнергетической диссоциацией соударением с азотом в качестве газа-реактанта.

II.3. Методики получения и изучения свойств молекулярно-импринтированных сорбентов/носителей

II.3.1. Импринтинг на трековых мембранах

а) *Нанесение полиэлектролитных мультислоев на трековую мембрану для получения молекулярных отпечатков экдистена*

Готовили растворы полиэлектролитов ($1 \cdot 10^{-2}$ М по мономеру): гидрохлорида полиаллиламина (ПААГХ) в 95%-м этаноле (ОАО «Медхимпром») с добавкой 5 об.% воды и полиакриловой кислоты (ПАК) в 95%-м этаноле. В растворы полиэлектролитов вводили 0,1 М ионной жидкости [BMIm][BF₄] (ИЖ).

При получении импринтированной мембраны в растворы также добавляли экдистен до концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М.



Рис. 13. Схема и фотографии диффузионной ячейки

Мембрану закрепляли в диффузионной ячейке (рис. 13), в качестве принимающего раствора использовали 0.1 М этанольный раствор ИЖ, в качестве питающего – раствор наносимого полиэлектролита, содержащего 0.1 М ИЖ. Сначала в течение 15 мин проводили диффузию катионного полиэлектролита, затем промывали мембрану в 1 мл этанола и в течение 15 мин осуществляли диффузию анионного полиэлектролита. Затем вновь наносили катионный полиэлектролит, и т. д. Все слои наносили с одной стороны мембраны. Далее при изучении диффузии через мембрану модельные соединения вводили со стороны нанесения полиэлектролитов.

Для термической сшивки слоев полиэлектролитов мембрану после нанесения бислоя помещали в сушильный шкаф на 2 ч при 140°C. Для ковалентной сшивки в качестве сшивающих агентов применяли глутаровый диальдегид и эпихлоргидрин.

Методика (2) сшивки полиэлектролитов с использованием глутарового альдегида [13]. Сшивку проводили непосредственно в диффузионной ячейке. При нанесении последнего слоя полиэлектролита (ПАК) к 1.5 мл питающего раствора добавляли 0.5 мл 0.5%-го раствора глутарового альдегида в этаноле, приготовленного разбавлением 95%-м этанолом 50%-го водного раствора глутарового альдегида. Через 15 мин питающий раствор сливали, вынимали

мембрану из диффузионной ячейки, помещали ее на лист фильтровальной бумаги слоем полиэлектролита вверх и оставляли при комнатной температуре на 2 ч.

Сшивку с использованием эпихлоргидрина в качестве сшивающего агента проводили по методикам 2 и 3, заменяя раствор глутарового альдегида на 0.5%-й раствор эпихлоргидрина в этаноле.

б) Изучение диффузии экдистена

При изучении диффузии через трековую мембрану концентрацию экдистена в питающем, принимающем растворе и растворе после отмывки мембраны контролировали с помощью УФ-спектроскопии (спектрофотометр Agilent 8453) по заранее построенной градуировочной зависимости $y = ax + b$, где y – оптическая плотность при 243 нм, x – концентрация экдистена в его этанольном растворе (М), $a = 1.2 \cdot 10^4$, $b = -0.0035$.

II.3.2. Импринтинг на силикагеле

а) Методики получения сорбентов с молекулярными отпечатками

Сорбенты «силикагель – БСА»

Методика (4) алкилирования и восстановления БСА

Навеску БСА растворяли в боратном буферном растворе (0.05М, рН 9.3) для получения раствора белка с концентрацией 30 мг/мл, тщательно перемешивали и оставляли в холодильнике на ночь для полного растворения. Для алкилирования белка использовали 0.5М иодацетамид (готовили непосредственно перед использованием раствором навески в деионизованной воде), а восстанавливающим реагентом являлся 200 мМ раствор трибутилфосфина.

Перед дальнейшей работой исходный раствор белка (30 мг/мл) разбавляли в 3 раза боратным буферным раствором (0.05М, рН 9.3) для получения раствора БСА с концентрацией 10 мг/мл, так как эта концентрация белка в растворе оптимальна для проведения его алкилирования и восстановления в соответствии с методикой Sigma–Aldrich (рН должен быть не менее 7.5).

Для восстановления белка к 9 мл его раствора с концентрацией 10 мг/мл добавляли 225 мкл ТБФ (25 мкл реагента на 10 мг белка, конечная концентрация ТБФ составляла 5 мМ) и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. После добавления ТБФ раствор белка немного мутнел, но после 30 мин инкубации снова

становился прозрачным. Далее к этому же раствору добавляли 270 мкл раствора иодацетамида (30 мкл ИАА на каждые 10 мг белка) и выдерживали в темноте 1 ч (конечная концентрация ИАА составляла 15 мМ). Так как иодацетамид может реагировать с другими аминокислотами (а не только с восстановленными дисульфидными мостиками) при длительном инкубировании или хранении, его избыток удаляли добавлением дополнительного количества ТБФ (225 мкл, или 25 мкл на каждые 10 мг белка) с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 15 мин. Для осаждения возможных нерастворимых веществ раствор восстановленного и алкилированного БСА центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин.

Методика (5) очистки восстановленного и денатурированного белка от избытка реагентов и продуктов реакции с использованием наконечников HyperSep Tip

Кондиционирование сорбента проводили набиранием и последующим спусканием 50 мкл метанола (повторяли 5 раз), а затем 20 мкл 0.1% HCOOH. Для концентрирования белка на сорбенте набирали по 25 мкл раствора денатурированного БСА (после алкилирования и восстановления, 10 мг/мл) и спускали аликвоту (повторяют операцию 20-30 раз). Для промывки сорбента с белком набирали 20 мкл 0.1% HCOOH и затем спускали аликвоту и отбрасывали ее (повторяли 10 раз). Элюирование белка с поверхности сорбента проводили 20 мкл метанола, аликвоту набирали и отбрасывали (повторяли 15 раз), аликвоты белка объединяли и выпаривали в токе азота, после чего перерастворяли в необходимом объеме боратного буферного раствора (0.05M, pH 9.3).

Для повторного использования наконечника его промывали 3 раза по 20 мкл 0.1% HCOOH и снова проводили концентрирование белка на сорбенте.

Методика (6) ковалентной пришивки белка БСА на поверхность SiO₂ с привитыми группами иминодиуксусной кислоты [122]

Навеску SiO₂-ИДК (0.2 г) помещали в стеклянную вials емкостью 4 мл и для полного протонирования поверхностных групп промывали ее 2 мл 0.1M HCl в течение 10 мин при интенсивном перемешивании, надосадочный слой отбирали дозатором и повторяли операцию. Затем навеску силикагеля дважды промывали

двумя миллилитрами деионизованной воды при интенсивном перемешивании в течение 10 мин, а затем 1 раз 2 мл этанола. После каждой промывки надосадочный слой удаляли с помощью дозатора.

После высушивания навески к ней добавляли по 0.5 мл растворов ГС (0.15М) и ЭДК (0.3М). Растворы ГС и ЭДК с необходимыми концентрациями получали разбавлением ДМСО исходных веществ. Силикагель затем помещали в термостат (37 °С) и выдерживали в течение ночи при перемешивании. Затем отмывали образец от избытка реагентов с помощью 1 мл ДМСО 10 мин при интенсивном перемешивании (повторяли 5 раз), добавляли 200 мкл ДМСО и рассчитанную аликвоту раствора БСА 10 мг/мл, (на 0.1 г SiO₂ 0.25 мг БСА), помещали образец в шейкер в холодильник (4°С) и выдерживали 24 ч при перемешивании. Затем добавляли диэтаноламин (0.6 ммоль на 0.2 г SiO₂) и выдерживали образец в термостате при 37°С 3 ч. После отмывали образец от диэтаноламина и избытка несвязанного белка добавлением 0.5 мл боратного буфера (0.05М, рН 9.3) (перемешивали 5 мин и отбирали надосадочный слой, повторяли 5 раз).

Для синтеза импринтированных сорбентов предварительно в раствор БСА добавляли необходимую навеску экдистена для получения его конечной концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М (раствору давали постоять в холодильнике в течение суток для образования комплекса экдистена с белком).

После синтеза образцов отмывали темплат фосфатным буфером (рН 6.5), этанолом, ацетонитрилом и ДМСО. Для этого 0.5 мл требуемого растворителя вносили в виалу с образцом и 10 мин перемешивали на ротационном миксере, затем центрифугировали при 2000 об/мин, отбирали надосадочный слой и анализировали его на содержание экдистена методом ВЭЖХ-МС (и так для каждого растворителя последовательно).

Методика (7) нековалентной пришивки белка БСА в присутствии ПААГХ на поверхность SiO₂ с группами иминодиуксусной кислоты

Навеску SiO₂-ИДК (0.2 г) промывали 2 раза 0.1М HCl, 2 раза деионизованной водой и 1 раз этанолом, как описано в методике (6). Затем прибавляли 0.1М водный раствор ПААГХ в 0.5М NaCl (из расчета 2.7 мл раствора ПААГХ на 0.1 г SiO₂) и интенсивно перемешивали 10 мин, затем отбирали

надосадочный слой с помощью дозатора и промывали 2 раза по 1 мл 0.5М NaCl (при интенсивном перемешивании в течение 5 мин), отбирали надосадочный слой и добавляли раствор БСА 10 мг/мл в боратном буфере (0.05М, рН 9.3) (из расчета 0.29 г БСА на 0.1 г SiO₂) и перемешивали 30 мин, затем удаляли надосадочный слой и промывали образец 1 мл боратного буферного раствора (0.05М, рН 9.3) при перемешивании (2 раза по 5 мин), удаляли надосадочный слой и добавляли аликвоту ПААГХ (такую, как и в первый раз), перемешивали 10 мин и затем снова промывали 2 раза по 5 мин 1 мл 0.5М NaCl. Образец хранили при комнатной температуре.

Для получения импринтированных образцов сорбентов использовали растворы ПААГХ и БСА, содержащие $1 \cdot 10^{-3}$ М экдистена (растворам давали постоять в холодильнике в течение суток для образования комплекса экдистена с белком и полимерами).

После окончания синтеза образцы отмывали от темплата, как описано в предыдущем пункте.

Сорбенты «силикагель – лейцин»

Методика (8). Навески силикагеля (108 мг для контрольного образца, 116 мг – для импринтированного) отмывали 2 раза по 1 мл при перемешивании в 0.1 М HCl, затем 2 раза в воде и 1 раз в этаноле. К навеске силикагеля, используемой для получения для импринтированного образца, добавляли смесь 30 мкл ЭДК и навеску пентафторфенола (73 мг) в 2 мл изопропанола и перемешивали 90 мин. Затем удаляли надосадочный раствор декантацией. Для нанесения темплата к навеске добавляли 1 мл 0.001М раствора экдистена в 0.025М боратном буфере (рН 9.3) и перемешивали 5 мин, после чего надосадочный слой удаляли декантацией. Затем к навеске добавляли 1 мл 0.025М раствора лейцина в воде, 175 мкл 0.02М ПЭИ, 240 мкл 0.004М раствора экдистена в 0.025М буре и 100 мкл свежеприготовленного раствора ЭДК в воде (50 мг на 200 мкл воды).

Для получения контрольного образца экдистен на силикагель не наносили, а вместо его аликвоты добавляли 1 мл деионизованной воды.

Поликонденсацию проводили в течение 2 сут при комнатной температуре. После синтеза образцов отмывали темплат фосфатным буфером (рН 6.5), этанолом, ацетонитрилом и ДМСО. Для этого 0.5 мл требуемого растворителя вносили в

виалу с образцом и 10 мин перемешивали на ротационном миксере, затем центрифугировали при 2000 об/мин, отбирали надосадочный слой и анализировали его на содержание экдистена методом ВЭЖХ-МС (и так для каждого растворителя последовательно).

б) Изучение сорбционных свойств полученных сорбентов

Методика (9). Полученные сорбенты на основе силикагеля, покрытого одним из описанных выше видов матриц с молекулярными отпечатками, изучали на предмет сорбции экдистена из водных растворов. Для этого готовили раствор экдистена ($1 \cdot 10^{-4}$ М) в смеси 80% этанол – HCl (на 8 мл 80% этанола вводили 1 мл 2 М HCl), затем 0.5 мл полученного раствора экдистена добавляли к отмытым от темплата образцам силикагеля и перемешивали на орбитальном миксере 30 мин. Надосадочный слой отбирали и анализировали его на содержание экдистена методом ВЭЖХ-МС/МС, количество сорбированного экдистена рассчитывали по разности его содержания в растворе до и после сорбции.

Перед элюированием сорбированного экдистена промывали сорбент 80%-ным этанолом (0.5 мл) 10 мин при перемешивании, надосадочный слой удаляли. Для элюирования экдистена добавляли к сорбенту 0.5 мл смеси этанол/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (80/5/15), перемешивали на орбитальном миксере 10 мин.

Методика (10). а) Для получения сухого экстракта серпухи венценосной надземные части (стебли и листья) растения высушивали, измельчали и экстрагировали 40%-ным этанолом (1:100 масс., 2 ч), экстракт сгущали на роторном испарителе и подвергали лиофильной сушке (72 ч, при температуре от – 55 до +24 °С).

б) Для изучения сорбции фитостероидов из экстракта серпухи к навеске сухого экстракта (23.1 мг) добавляли 10 мл ДМСО, 10 мин перемешивали на орбитальном шейкере и на 10 мин помещали в УЗ-ванну. К навеске исследуемого образца сорбента добавляли 0.1 мл полученного экстракта в ДМСО и 0.4 мл смеси 80% этанол/HCl и перемешивали на орбитальном миксере 30 мин. Дальнейшее исследование проводили согласно методике сорбции из модельных растворов экдистена.

II.3.3. Импринтинг на диоксиде титана

а) Получение сорбентов с молекулярными отпечатками

Методика (11). В колбу емкостью 250 мл помещали 50–100 мг нанопорошка оксида титана(IV) и 65 мл 0.03% (об./об.) раствора воды в толуоле (для этого в указанный объем толуола вводили 20 мкл воды при перемешивании) и перемешивали содержимое колбы 2.5 ч при 300 об/мин. Далее 5 мг темплата растворяли в 6.5 мл абсолютного этанола, добавляли 315 мкл буюксида титана, перемешивали, помещали на УЗ-баню на 5 мин и оставляли на 30–40 мин. Для приготовления неимпринтированного сорбента темплат не добавляли, а аликвоту буюксида титана растворяли непосредственно в 6.5 мл этанола. Если в качестве темплата использовали соединение экдистена с 3-аминофенилборной кислотой (АФБК), то отдельно растворяли 5 мг экдистена и 18.1 мг АФБК (мольное соотношение экдистен : АФБК = 1:10) в 1 мл абсолютного этанола каждый, объединяли эти растворы, доводили общий объем до 6.5 мл абсолютным этанолом и добавляли 270 мкл буюксида титана. После перемешивания и сонирования (5 мин) оставляли смесь на 30–40 мин.

К полученной суспензии TiO_2 в толуоле добавляли раствор смеси темплата с буюксидом, перемешивали в течение 5 ч и затем выдерживали 1 сутки при $5 \pm 2^\circ C$. Полученный продукт (мелкодисперсный осадок бежевого цвета) фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента), промывали с помощью 10 мл 0.03% (об./об.) раствора воды в толуоле и сушили на фильтре в сушильном шкафу при $55^\circ C$ в течение 12 ч. Для отмывки темплата к осадку добавляли 2 мл 1%-го раствора гидроксида калия в 95% этаноле и сонировали 1 ч при $50^\circ C$, после чего дозатором отбирали надосадочный слой и снова добавляли 2 мл 1%-го этанольного раствора гидроксида калия; такую отмывку повторяли еще 3 раза. Осадок сушили в токе азота и оставляли на воздухе до полного высыхания.

Методика (12) пришивки поверхностных групп на поверхность модифицированного TiO_2 [123]

К навеске (100 мг) модифицированного TiO_2 (не отмытого от темплата) добавляли 2 мл диоксана, перемешивали 30 мин до получения суспензии, затем медленно добавляли 45 мкл триэтаноламина и 40 мкл 2-бромизобутирилбромида. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при комнатной температуре, после чего осадок отделяли центрифугированием (3500 об/мин) и промывали 3 раза по 4 мл

смесью ацетон / вода (5/1 об.). Полученный $\text{TiO}_2\text{-Br}$ снова диспергировали в 2 мл диоксана при перемешивании (30 мин) и добавляли 68 мг ДЭДТК·3 H_2O , реакцию проводили при перемешивании при комнатной температуре 24 ч. Полученный осадок снова отделяли центрифугированием (3500 об/мин) и промывали 3 раза по 4 мл смесью ацетон / вода (5/1 об.).

Полученный $\text{TiO}_2\text{-ДЭДТК}$ высушивали при 40°C в течение ночи, затем добавляли к нему 2 мл диоксана, 0.16 г акриламида и 0.06 мг АИБН. Полимеризацию проводили при 70°C 24 ч при перемешивании. Затем суспензию центрифугировали, промывали осадок гексаном (3 × 4 мл) и сушили при 40°C в течение ночи.

Методика (13) пришивки поверхностных групп на поверхность модифицированного TiO_2 . [124]

К навеске (100 мг) модифицированного TiO_2 (не отмытого от темплата) добавляли 2 мл ацетона, перемешивали 30 мин до получения суспензии, и добавляли 50 мг 3-(триметоксисилил)пропилметакрилата (MPS) и перемешивали в течение 15 мин. Затем в качестве катализатора добавляли малеиновый ангидрид (1.5 мг предварительно растворяли в 50 мкл деионизованной воды). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании смеси 1 ч при комнатной температуре и затем 2 ч при 60°C. После остывания осадок отделяли с использованием центрифужных фильтров Eppendorf с мембраной (фторопласт, 0.22 мкм), промывали ацетоном 3 раза по 2 мл и сушили 24 ч при 30°C.

Далее по методике [125] к навеске сорбента (100 мг) добавляли 83.4 мл ацетонитрила, затем виалу помещали в УЗ-баню для получения суспензии. Далее добавляли акриламид (14 мг), ЭГДМА (0.22 мл) и АИБН (8.3 мг) при перемешивании. Через полученную смесь пропускали азот в течение 10 мин (при этом виалу помещали в ледяную баню). Затем проводили двуступенчатую реакцию полимеризации: 1) 6 ч при 50°C; 2) 24 ч при 60°C; 3) 6 ч при 80°C. Затем сорбент промывали ацетоном (3 раза по 4 мл), отделяли центрифугированием и сушили при 50°C в течение 4 ч.

Методика (14) пришивки поверхностных групп на поверхность модифицированного TiO₂. [126]

К навеске (100 мг) модифицированного TiO₂ (не отмытого от темплата) добавляли 4 мл толуола, перемешивали 30 мин до получения суспензии, добавляли 300 мг АПТЭС и проводили реакцию при перемешивании при 115°C 6 ч. Затем осадок отделяли с использованием центрифужных фильтров Eppendorf с мембраной (фторопласт, 0.22 мкм), промывали толуолом (3 × 4 мл) и сушили при комнатной температуре 24 ч.

Полученный продукт (TiO₂-NH₂) переносили в виалу, добавляли 3 мл дихлорметана, перемешивали 30 мин до получения суспензии и добавляли 0.22 г триэтиламина (0.30 мл). Виалу помещали в ледяную баню и проводили реакцию при 0°C при перемешивании в течение 40 мин. Далее по каплям добавляли 0.49 г 2-бромизобутирилбромида (0.27 мл) и 0.4 мл дихлорметана и продолжали реакцию еще 4 ч при 0°C при перемешивании и далее в течение ночи при комнатной температуре (около 21°C). Полученный TiO₂-Br промывали ацетоном (3 раза по 4 мл), отделяли с использованием центрифужных фильтров Eppendorf с мембраной (фторопласт, 0.22 мкм) и сушили при комнатной температуре.

Далее по методике [125] к навеске сорбента (100 мг) добавляли 83.4 мл ацетонитрила, затем виалу помещали в УЗ-баню для получения суспензии. Далее добавляли акриламид (14 мг), ЭГДМА (0.22 мл) и АИБН (8.3 мг) при перемешивании. Через полученную смесь пропускали азот в течение 10 мин (при этом виалу помещали в ледяную баню). Затем проводили двуступенчатую реакцию полимеризации: 1) 6 ч при 50°C; 2) 24 ч при 60 °C; 3) 6 ч при 80 °C. Сорбент затем промывали ацетоном (3 раза по 4 мл), отделяли центрифугированием и сушили при 50°C в течение 4 ч.

Сорбенты, полученные по методикам (11 – 13), затем отмывали от темплата раствором КОН в этаноле (см. Методику 10).

б) Изучение образования комплекса экдистен – борная кислота методом нормально-фазовой ВЭЖХ

Методика (15). Разделение проводили в изократическом режиме с использованием изопропанола в качестве элюента. Температура автосамплера

составляла 17°C, температура колонки 25°C, время анализа 20 мин, объем вводимой пробы 10 мкл. Детектировали при 220 нм.

в) Сорбция фитостероидов на картриджах с C18

Методика (16). Сорбционные свойства импринтированного сорбента сравнивали со свойствами силикагеля с привитыми группами C₁₈. Для этого использовали картриджи Zorbax C18, которые сначала кондиционировали (4 мл метанола, затем 4 мл деионизованной воды), далее пропускали пробу (5 мл), промывали картридж водой (4 мл) и элюировали метанолом (4 раза по 1 мл). Элюат собирали в виалу, выпаривали в токе азота, перерастворяли в 100 мкл метанола и анализировали методом ВЭЖХ-МС.

III. Результаты и обсуждение

III.1. Определение фитостероидов в растительных экстрактах и фармпрепаратах методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения

ВЭЖХ-МС/МС – один из наиболее информативных и эффективных методов органического анализа. В отличие от обычного масс-спектра, спектры второго порядка (МС/МС) получают при фрагментации ионов-предшественников целевых аналитов. Тандемная масс-спектрометрия приводит к существенному улучшению селективности, так как позволяет выбрать и использовать характеристичные (для каждого соединения или их группы) переходы *ион-предшественник* → *ион-продукт* (режим регистрации выбранных реакций), при этом также возрастают точность и чувствительность анализа.

При использовании современных техник детектирования можно повысить чувствительность и селективность анализа сложных матриц, таких как матрица растительного экстракта. Метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения позволяет получить значения масс определяемых веществ с точностью до 5 миллионных долей (м.д.), что делает обнаружение целевых аналитов в сложных матрицах более селективным, чем при использовании масс-спектрометрии низкого разрешения. Этот метод позволяет однозначно обнаружить наличие и определить содержание каждого аналита в смеси.

Авторы многих работ [94, 101, 106, 107, 110, 117, 121] отмечают, что масс-спектрометрическое детектирование после ВЭЖХ-разделения – наиболее подходящий метод анализа растительных экстрактов. Однако для соединений группы фитостероидов в литературе описаны в основном масс-спектры низкого разрешения, причем лишь отдельных соединений [101, 117], а спектры высокого разрешения приводятся редко [121]. Для некоторых соединений можно найти экспериментально полученные значения точных масс ионов [M+H] или [M-H] [107, 105], однако эти данные не систематизированы. Не указывается также, в каком режиме ионизации лучше регистрировать соединения этого класса. Поэтому для достоверной идентификации фитостероидов в матрице растительного экстракта целесообразно более детальное изучение их масс-спектрометрических

характеристик с применением тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Использование этого метода позволило бы также идентифицировать соединения этой группы при отсутствии стандартных образцов для каждого фитостероида.

Итак, задачи данного этапа работы были следующими:

- изучить масс-спектрометрические характеристики фитостероидов (на примере стандартов – экдистена и туркестерона) и установить закономерности их фрагментации по масс-спектрам второго порядка;

- на основе масс-спектров первого и второго порядков для стандартов фитостероидов установить, какие переходы «ион-предшественник → ион-продукт» и закономерности фрагментации могут быть использованы в качестве характеристичных при отнесении неизвестного соединения к классу фитостероидов;

- на основе ВЭЖХ-МС-анализа экстрактов серпухи венценосной и левзеи обнаружить соединения, предположительно являющиеся фитостероидами, и далее подтвердить или опровергнуть это с использованием выводов, сделанных при определении стандартов фитостероидов;

- выполнить профилирование экстрактов серпухи венценосной и левзеи, определив количество найденных фитостероидов в расчете на экдистен (используя градуировочную зависимость для определения экдистена).

а) Масс-спектрометрические характеристики стандартов фитостероидов

На первом этапе работы получили масс-спектры высокого разрешения имеющихся в наличии стандартов фитостероидов: экдистена и туркестерона (рис. 14А, 15А). Предварительные эксперименты показали, что в режиме регистрации отрицательных ионов чувствительность определения этих соединений выше, а их масс-спектры интенсивнее и информативнее, чем в режиме регистрации положительных ионов (рис. 14А, В, С). Таким образом, в дальнейшей работе использовали только первый из указанных режимов.

Для масс-спектров первого порядка экдистена и туркестерона характерно наличие одного интенсивного пика $[M+HCOOH-H]^-$ — аддукта квазимолекулярного иона с муравьиной кислотой, являющейся компонентом

подвижной фазы. На рисунках 14А и 15А указаны рассчитанные брутто-формулы для соответствующих m/z , а также отклонение измеренных масс от теоретических значений.

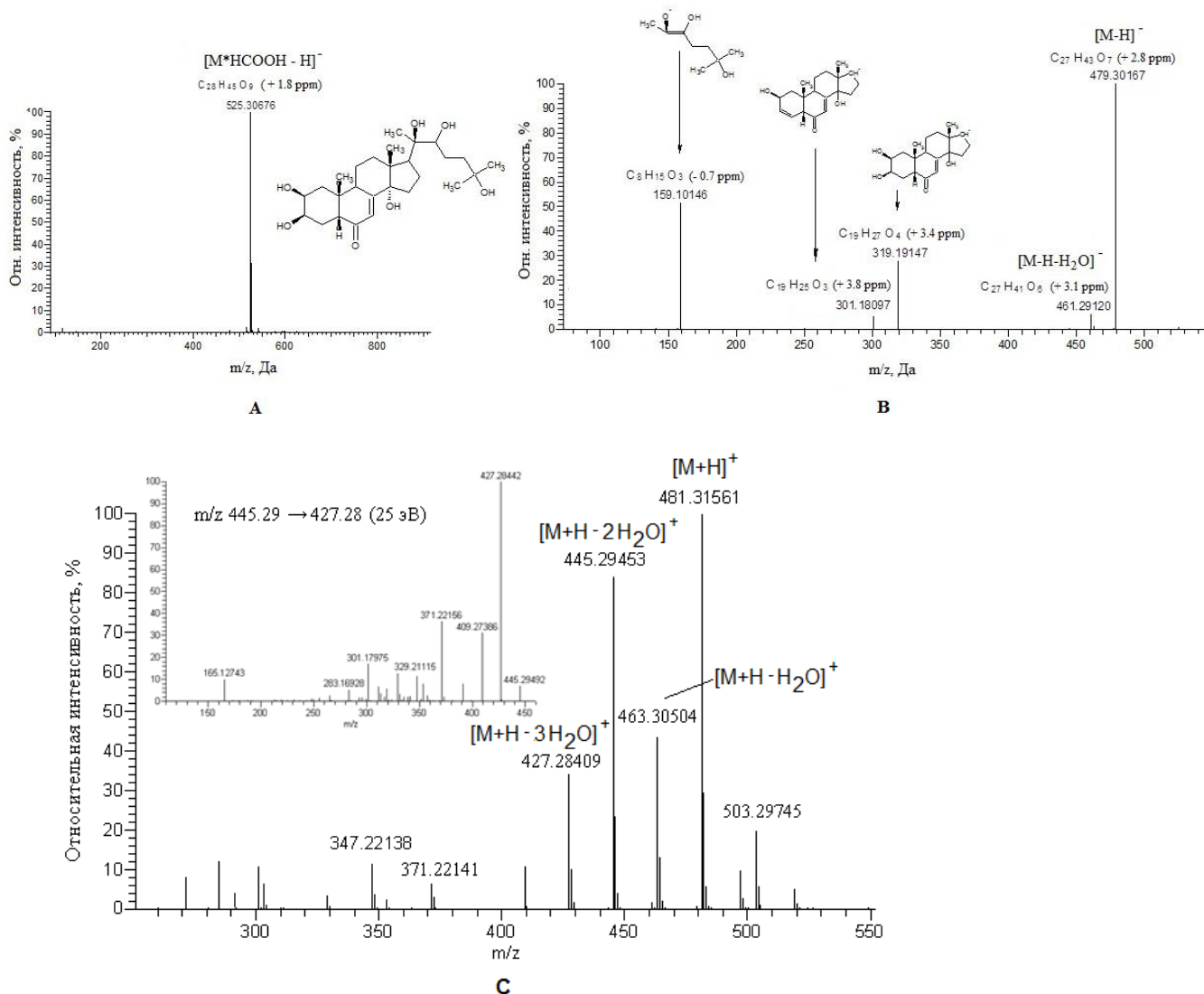


Рис. 14. Масс-спектры эхидстена: в режиме сканирования отрицательных ионов (А) и тандемный второго порядка (В) (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 525.31, энергия в соударительной ячейке 30 эВ), в режиме сканирования положительных ионов (С).

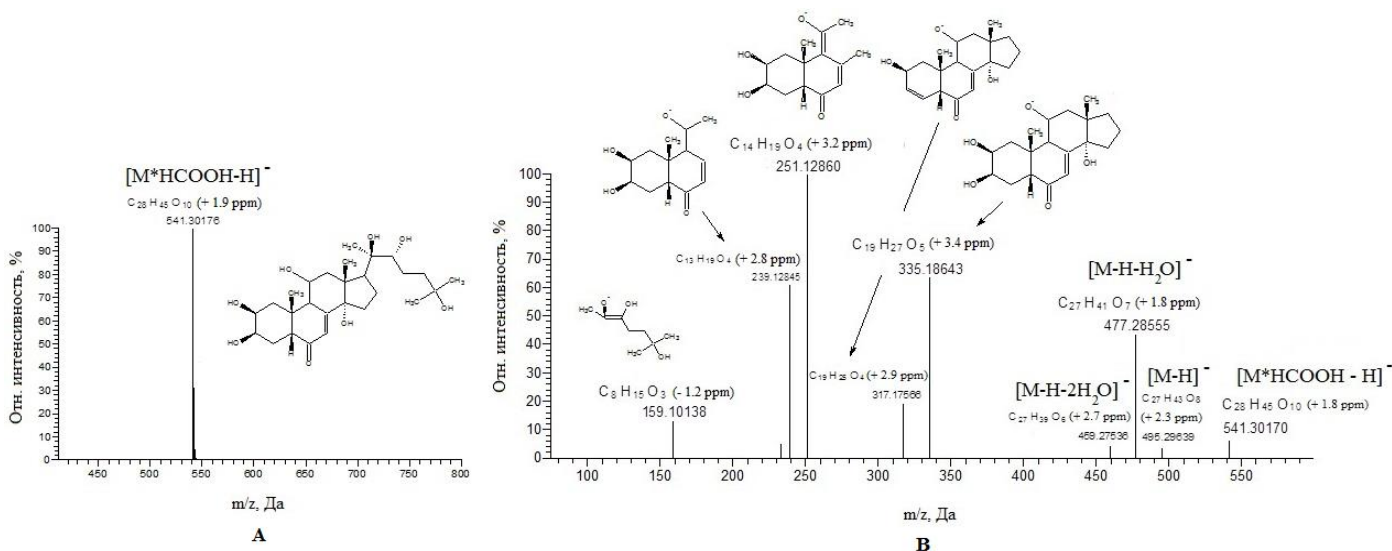


Рис. 15. Масс-спектры туркестерона: в режиме сканирования отрицательных ионов (А) и тандемный второго порядка (В) (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 541.30, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

С целью идентификации неизвестных фитостероидов изучена фрагментация экдистена и туркестерона. На рис. 14В и 15В показаны соответствующие масс-спектры второго порядка. Рассмотрен диапазон энергий от 10 до 30 эВ и выбрана энергия 30 эВ, при которой в спектрах второго порядка присутствуют интенсивные пики ионов-продуктов, соответствующих m/z фрагментов молекулы, содержащих стероидное ядро (кольца А, В, С, D, схема 2) и образующихся при отщеплении от исходной молекулы боковой цепи при С-17 (301 и 319 для экдистена; 317 и 335 для туркестерона). Эти значения масс могут служить характеристичными при идентификации неизвестных фитостероидов и их отнесении к этому классу соединений, так как они соответствуют фрагментам стероидного ядра, общим для данного класса соединений. Различие в m/z этих ионов связаны со структурными отличиями двух соединений: в молекуле туркестерона присутствует дополнительная ОН-группа в скелете при наличии того же бокового радикала при С-17, что и у экдистена.

Образуется фрагментный ион с m/z 301 (рис. 14В) за счет дегидратации иона с m/z 319. Мы предполагаем, что ОН-группа отщепляется из положения 3, так как дальнейшее образование двойной связи у этого атома углерода позволило бы стабилизировать получившийся ион за счет образования системы сопряженных двойных связей в положениях 5–7 после кето-енольной таутомеризации (схема 2).

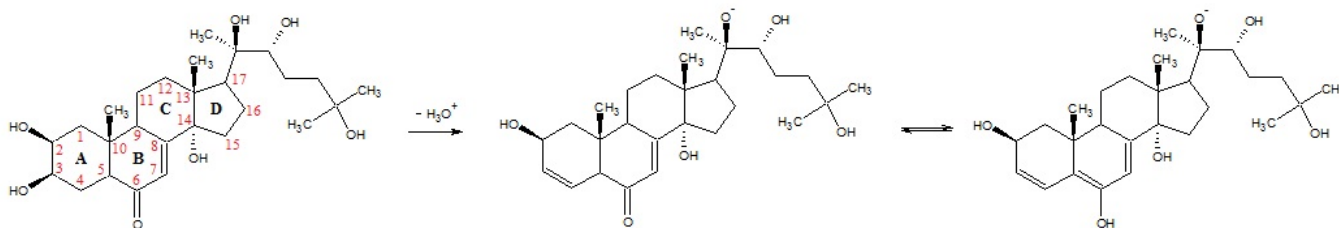


Схема 2. Структура эхдистена и процесс таутомерной интерконверсии с образованием 5,7-диеновой структуры.

Наличие в МС/МС-спектрах обоих стандартов сигнала с m/z 159 (рис. 14В, 15В) соответствует общему для эхдистена и туркестерона фрагменту, представляющему собой боковую цепь при С-17.

б) Анализ экстракта серпухи венценосной

Получение и пробоподготовка растительного экстракта серпухи венценосной (далее - экстракт) для ВЭЖХ-анализа. Для пробоподготовки экстракта серпухи венценосной к хроматографическому анализу высушенное и измельченное растительное сырье экстрагировали 40%-ным этанолом (при этом извлекается часть водорастворимых и часть липофильных компонентов). Затем экстракт сгущали на роторном испарителе и подвергали лиофильной сушке (72 ч, ступенчато при температуре от -55 до $+24$ °С), в результате чего получали сухой экстракт. Его навеску растворяли в диметилсульфоксиде (23 мг на 10 мл) и разбавляли в 10 раз 96%-ным этанолом, после чего анализировали методом ВЭЖХ-МС.

Определяли фитостероиды в экстракте серпухи венценосной методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС (рис. 16). Помимо эхдистена и туркестерона, в экстракте обнаружили несколько соединений, предположительно также принадлежащих к фитостероидам (ФС-1, ФС-2, ФС-3, ФС-4). Для однозначной их идентификации изучили масс-спектры первого и второго порядка (при 30 эВ).

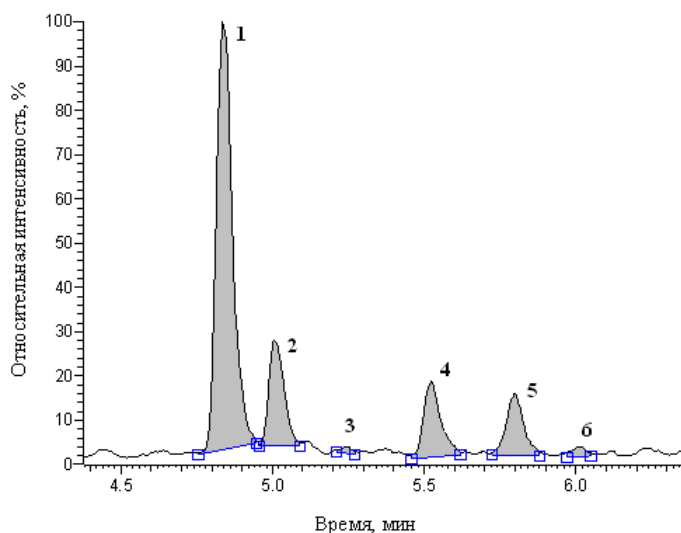


Рис. 16. Хроматограмма по полному ионному току экстракта серпухи венценосной в режиме регистрации отрицательных ионов: 1 – экдистен ($t_R = 4.82$ мин); 2 – туркестерон ($t_R = 5.00$ мин); 3 – ФС-1 ($t_R = 5.30$ мин); 4 – ФС-2 ($t_R = 5.54$ мин); 5 – ФС-3 ($t_R = 5.80$ мин); 6 – ФС-4 ($t_R = 6.00$ мин).

В МС/МС-спектре второго порядка (рис. 17) первого из предполагаемых фитостероидов (ФС-1) присутствуют характерные для экдистена ионы-продукты с m/z 301 и 319, содержащие стероидное ядро и совпадающие с ними по точной массе и рассчитанной брутто-формуле, что позволяет отнести соединение ФС-1 к классу фитостероидов.

Дальнейшее сопоставление спектров (рис. 14В и 17) позволило отнести m/z 493 к $[M-H]^-$ -иону ФС-1, а m/z 173 – к его боковому радикалу, отличающемуся от бокового радикала экдистена на одну CH_2 -группу. Согласно литературным данным [96], фитостероид с таким строением – это макистерон А, содержащийся в этом растении. Таким образом, ФС-1 является либо макистероном А, либо его изомером, отличающимся положением CH_2 -группы в радикале.

В тандемных масс-спектрах остальных предполагаемых фитостероидов – ФС-2, 3 и 4 (рис. 18, 19 и 20) также присутствуют фрагментные ионы с m/z 301 и 319, что позволяет отнести все эти соединения к классу фитостероидов.

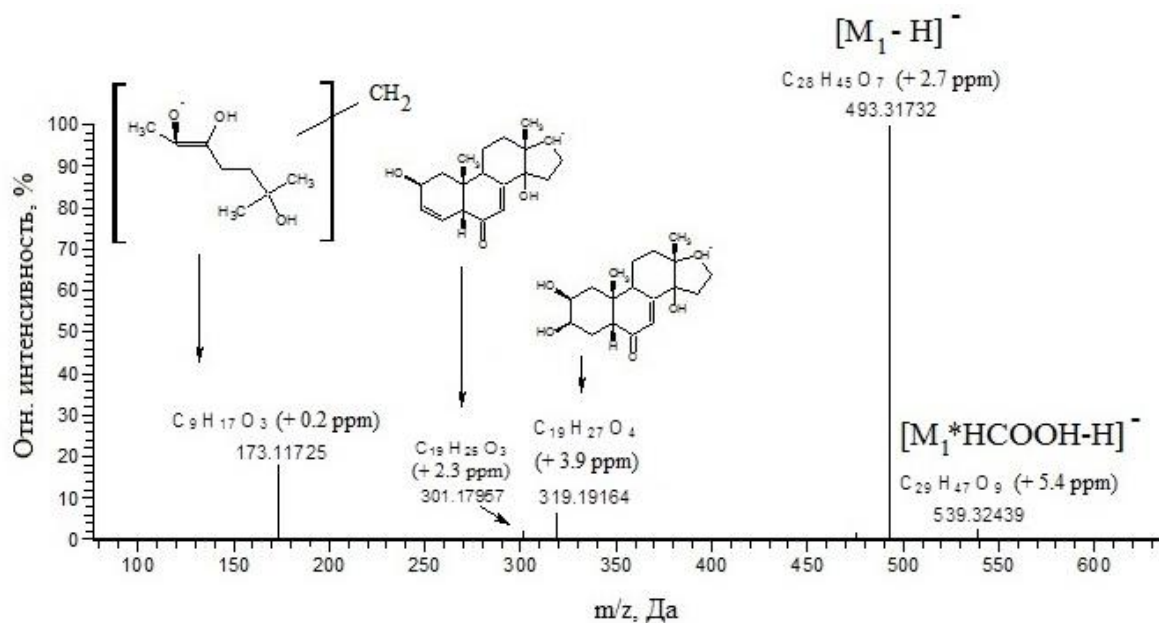


Рис. 17. Масс-спектр второго порядка ФС-1 (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 539.32, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

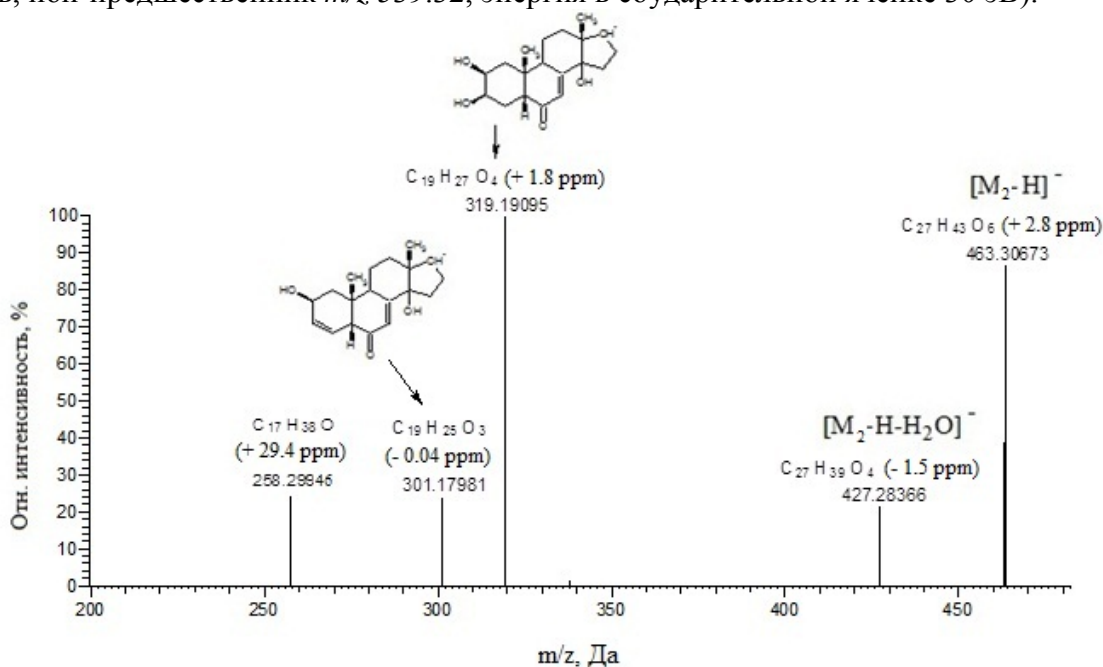


Рис. 18. Масс-спектр второго порядка ФС-2 (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 509.31, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

Соединение ФС-2 с квазимолекулярным ионом $[M-H]^-$ (m/z 463) (рис. 18) имеет такой же скелет, как и экдистен, о чем свидетельствует присутствие в спектре второго порядка ионов с m/z 301 и 319. Отличие ФС-2 ($C_{27}H_{44}O_6$) от экдистена ($C_{27}H_{44}O_7$) заключается в замене одного протона на ОН-группу, причем именно в боковом радикале при С-17. Этот вывод сделан при сравнении тандемных масс-спектров ФС-2 и экдистена (рис. 14В и 18). ФС-2 имеет общую с экдистеном стероидную часть молекулы, что подтверждается наличием m/z 301 и 319, а значит,

различие двух соединений заключается в строении бокового радикала при С-17. В пользу такого утверждения говорит и то, что фрагментация туркестерона (отличающегося от экдистена на ОН-группу в стероидном ядре при наличии одинаковых боковых радикалов при С-17) значительно отличается от фрагментации экдистена. Содержание ФС-2 в экстракте мало, и, возможно, из-за этого в спектре второго порядка не удалось зафиксировать пик его бокового радикала. Этот анализ соответствует экдизону, что согласуется с описанием его структуры в литературе [96].

МС/МС-спектр соединения ФС-3 содержит фрагментные ионы m/z 301 (дегидратированный фрагмент со стероидным ядром) и 159 (боковой радикал при С-17, совпадающий с радикалом в молекуле экдистена) (рис. 19). Спектр ФС-3 не содержит иона-продукта с m/z 319, а $[M-H]^-$ ФС-3 отличается от $[M-H]^-$ экдистена по брутто-формуле на одну молекулу H_2O , что позволяет предположить, что ФС-3 является аналогом экдистена, дегидратированным по одной из ОН-групп стероидного скелета. Согласно литературным данным [127], соединение ФС-3 соответствует дакрихайнанстерону.

В тандемном спектре соединения ФС-4 (рис. 20) присутствуют оба пика с m/z 301 и 319; значит, это соединение также является фитостероидом и имеет тот же стероидный скелет, что и экдистен. Фрагменту бокового радикала при С-17 соответствует ион-продукт с m/z 187, а значит, боковой радикал в молекуле ФС-4 отличается от бокового радикала при С-17 экдистена на две CH_2 -группы. Среди известных фитостероидов таким соединением является макистерон С [101].

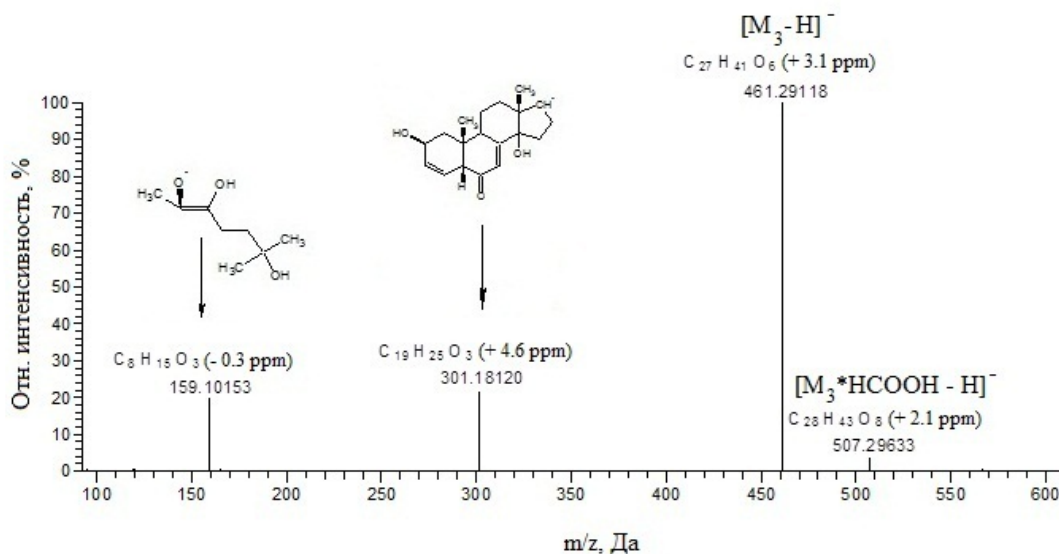


Рис. 19. Масс-спектр второго порядка ФС-3 (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 507.30, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

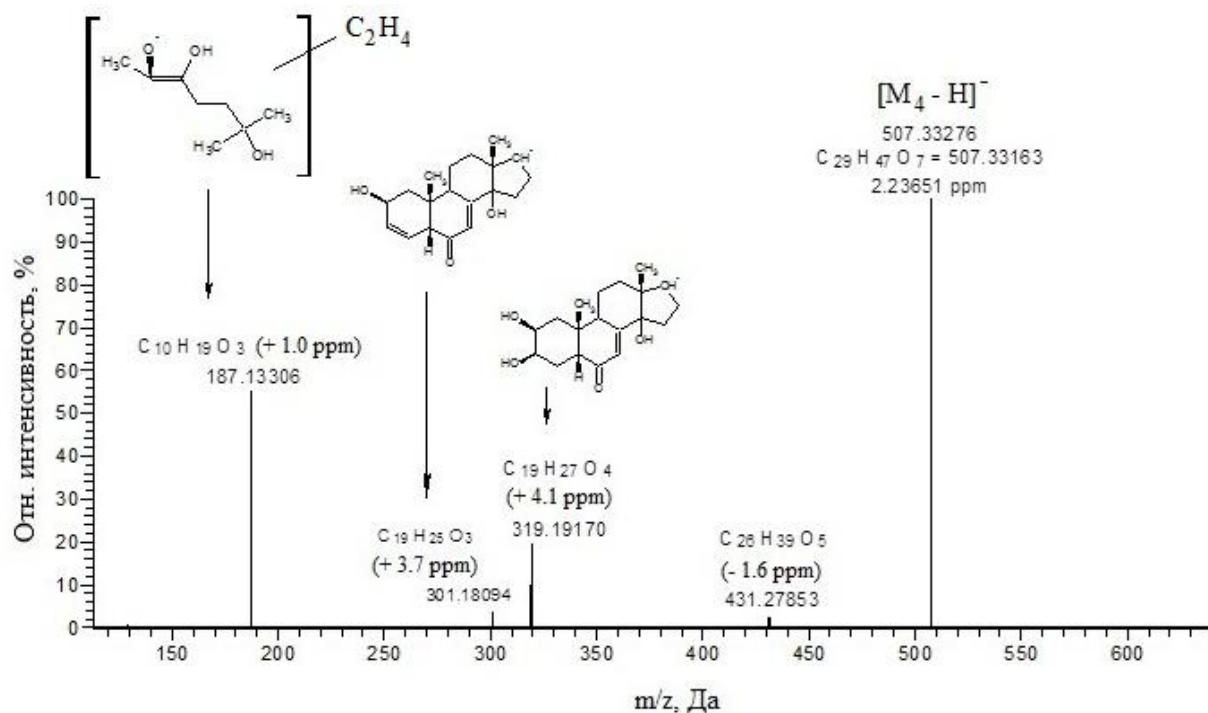


Рис. 20. Масс-спектр второго порядка ФС-4 (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 553.34, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

Спектры первого порядка ФС-1, ФС-2, ФС-3, ФС-4 содержат один интенсивный пик $[M^*HCOOH-H]^-$ — аддукта квазимолекулярного иона с муравьиной кислотой, как и в случае соответствующих спектров экидистена и туркестерона. Точные массы указанных ионов приведены в табл. 3.

Таблица 3. Экспериментально полученные значения точных масс ионов $[M-H]^-$ и $[M^*HCOOH-H]^-$

Аналит	$[M-H]^-$, Да	$[M+HCOOH-H]^-$, Да
Экидистен	479.30167	525.30676
Туркестерон	495.29639	541.30176
ФС-1 (макистерон А)	493.31732	539.32270
ФС-2 (экидизон)	463.30673	509.31208
ФС-3 (дакрихайнанстерон)	461.29118	507.29635
ФС-4 (макистерон С)	507.33276	553.33862

в) Определение фитостероидов в экстракте серпухи венценосной

Содержание экидистена и туркестерона в экстракте серпухи венценосной (табл. 4) определяли методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием коммерчески доступных стандартов этих веществ. Градуировочные зависимости в диапазоне от

5 нг до 5 мкг имели вид: для экидистена $y_1 = 56224 \cdot x$, коэффициент корреляции $r_1 = 0.997$; для туркестерона $y_2 = 15779 \cdot x$, коэффициент корреляции $r_2 = 0.995$. Содержания фитостероидов ФС-1, 2, 3, 4 оценивали по градуировочной зависимости для экидистена.

Таблица 4. Содержание фитостероидов в экстракте серпухи венценосной (*Serratula coronata*) (n = 3, P = 0.95)

Аналит	Содержание в экстракте, мг/г
Экидистен	8.2 ± 0.7
Туркестерон	1.5 ± 0.3
ФС-1 (макистерон А)	0.05 ± 0.01
ФС-2 (экидизон)	0.10 ± 0.02
ФС-3 (дакрихайнанстерон)	0.80 ± 0.06
ФС-4 (макистерон С)	0.040 ± 0.005

г) Анализ препаратов на основе левзеи

При хроматографическом анализе препаратов на основе левзеи в их составе был найден экидистен, а также еще одно соединение, предположительно являющееся фитостероидом (рис. 21). Этот аналит совпадал по рассчитанным брутто-формуле и точной молекулярной массе с экидистеном, т.е. был его изомером. Для определения принадлежности этого аналита к классу фитостероидов действовали по тому же алгоритму, что и при анализе серпухи венценосной (раздел III.1.б). В режиме регистрации отрицательных ионов получили масс-спектр второго порядка изучаемого аналита (рис. 22). Присутствующие в нем пики ионов-продуктов с m/z 317 и 335 по экспериментально полученным точным массам и рассчитанным брутто-формулам соответствуют фрагментам стероидного скелета в МС/МС-спектре одного из исследованных стандартов – туркестерона (рис. 15В). Таким образом, исследуемый аналит также принадлежит к классу фитостероидов. Как отмечено ранее (в п. III.1.а), m/z этих ионов-продуктов туркестерона отличаются от соответствующих m/z в спектре экидистена за счет наличия в стероидном скелете туркестерона дополнительной ОН-группы в положении С-11. При совпадении точных масс и брутто-формул рассматриваемого аналита и экидистена это означает, что в стероидном скелете изучаемого соединения на одну

ОН-группу больше, а в радикале при С-17 – на одну ОН-группу меньше. По литературным данным [128] среди фитостероидов, присутствующих в левзее, соединение с такой структурой – это аюгастерон С (рис. 22).

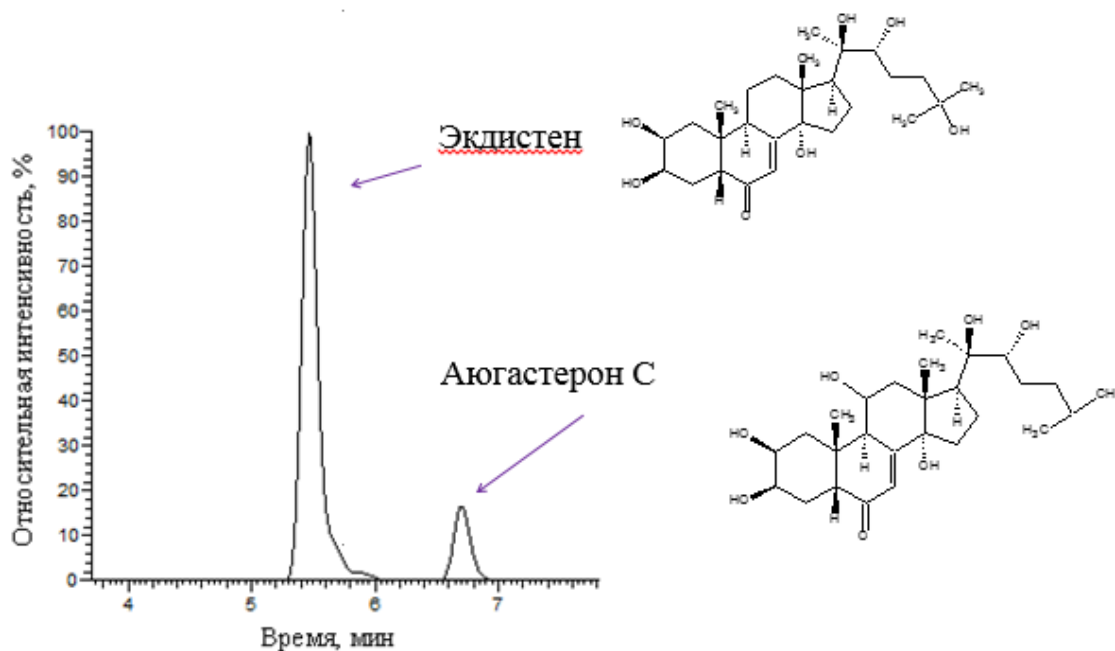


Рис. 21. Хроматограмма экстракта левзеи (экдистен – t_R 5.5 мин, аюгастерон С – t_R 6.7 мин) со структурами найденных в нем фитостероидов.

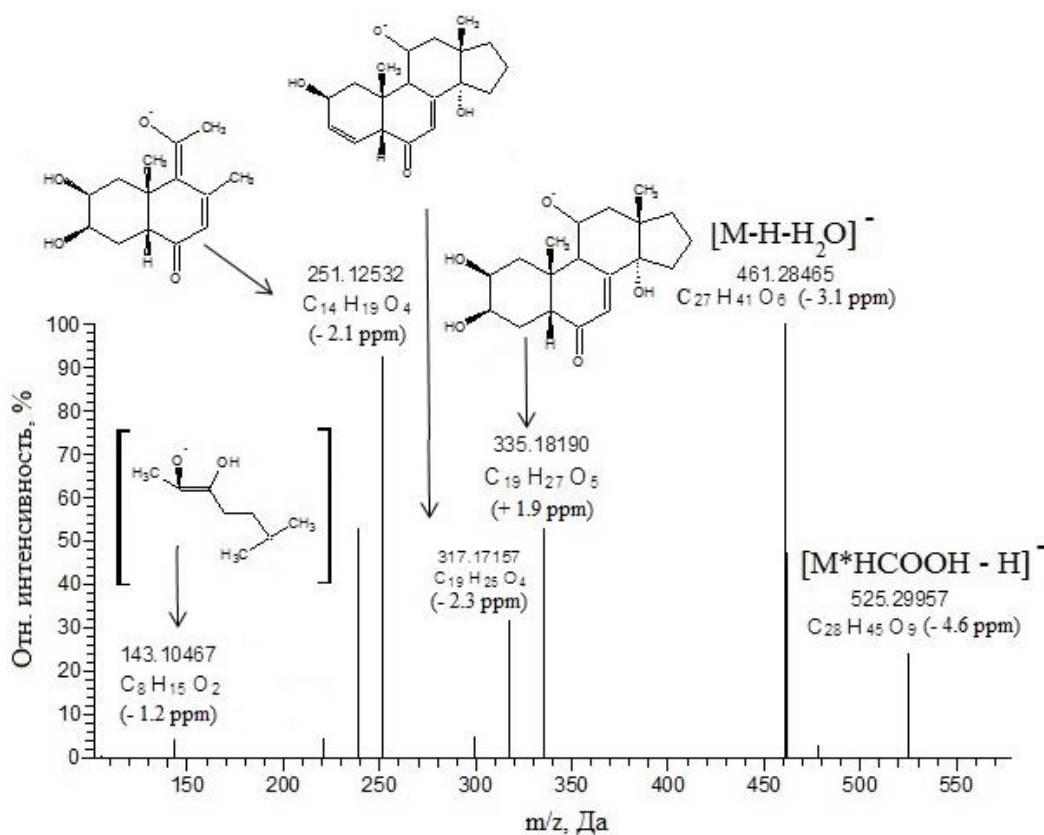


Рис. 22. Масс-спектр второго порядка изомера экдистена (аюгастерона С) (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 525.31, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

д) Определение фитостероидов в препаратах левзеи

Для определения фитостероидов в аптечном экстракте левзеи дозатором отбирали 1 мл препарата и добавляли к нему 3 мл 96% этилового спирта. Полученный раствор анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС (методика 1, Экспериментальная часть).

Для определения фитостероидов в таблетках «Левзея» одну таблетку помещали в виалу на 15 мл, добавляли 1 мл 0.1М HCl и помещали на 10 мин в УЗ-ванну. Далее к содержимому виалы добавляли 9 мл 96% этилового спирта и снова помещали в УЗ-ванну на 10 мин, затем центрифугировали при 2000 об/мин. Надосадочный слой далее анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС (методика 1, Экспериментальная часть).

Содержания фитостероидов (табл. 5), как и в пункте III.1, устанавливали по градуировочному графику для определения экидистена.

Таблица 5. Содержание фитостероидов в препаратах на основе левзеи (n= 3, P =0.95)

Препарат, единицы конц-ии	Экидистен	Аюгастерон С
Таблетки "Левзея", мкг/табл.	40 ± 3	5.0 ± 0.4
Экстракт левзеи, мкг/мл	365 ± 15	42 ± 2

е) Тандемные масс-спектры фитостероидов низкого разрешения

Для подтверждения возможности переноса выбранных условий идентификации фитостероидов на масс-спектрометры низкого разрешения такие спектры были получены для стандартов экидистена и туркестерона, закономерности фрагментации целевых аналитов при этом сохраняются (рис. 23, 24).

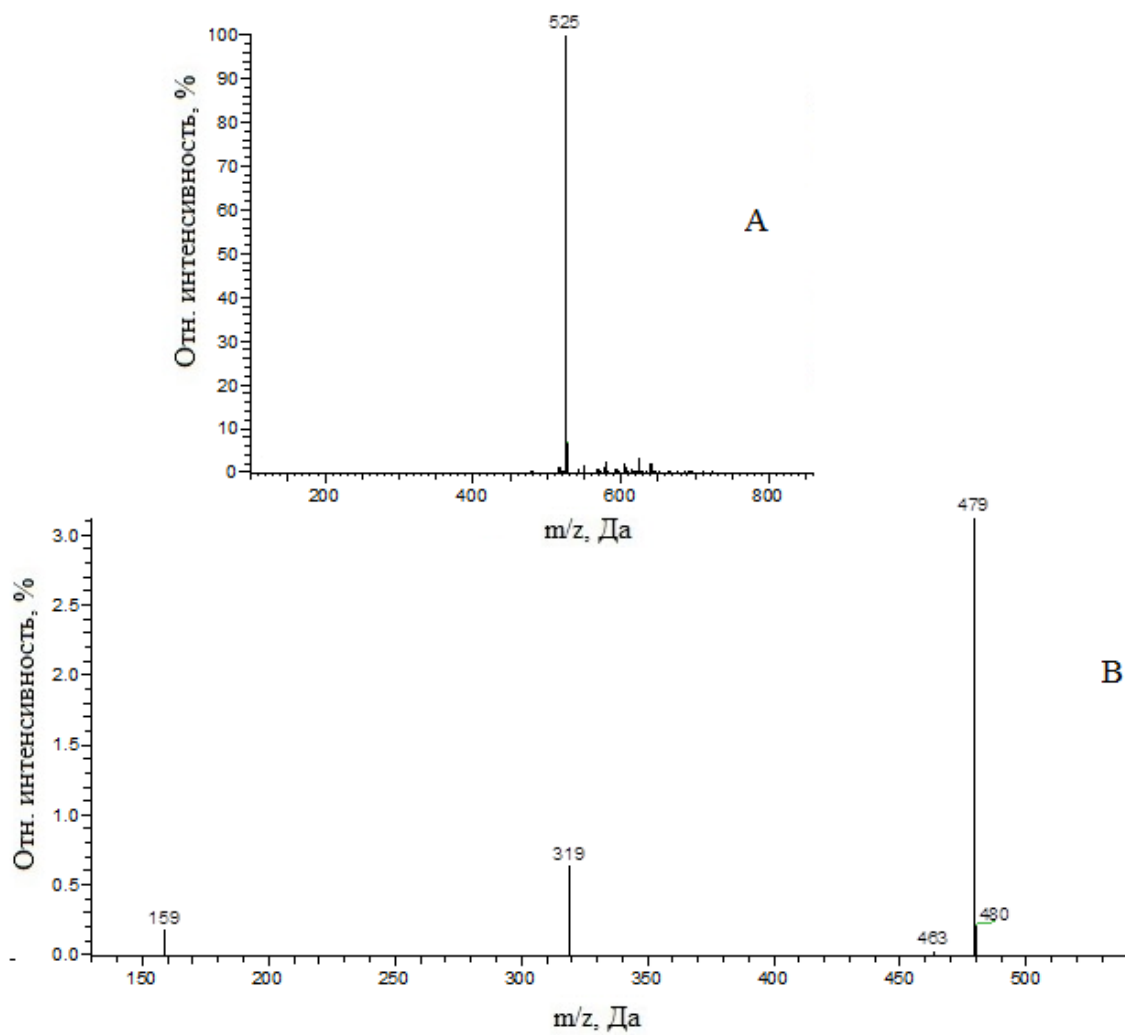


Рис. 23. Масс-спектры (низкого разрешения) эдиктена: в режиме сканирования отрицательных ионов (А) и тандемный (В) (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 525.3, энергия в соударительной ячейке 30 эВ)

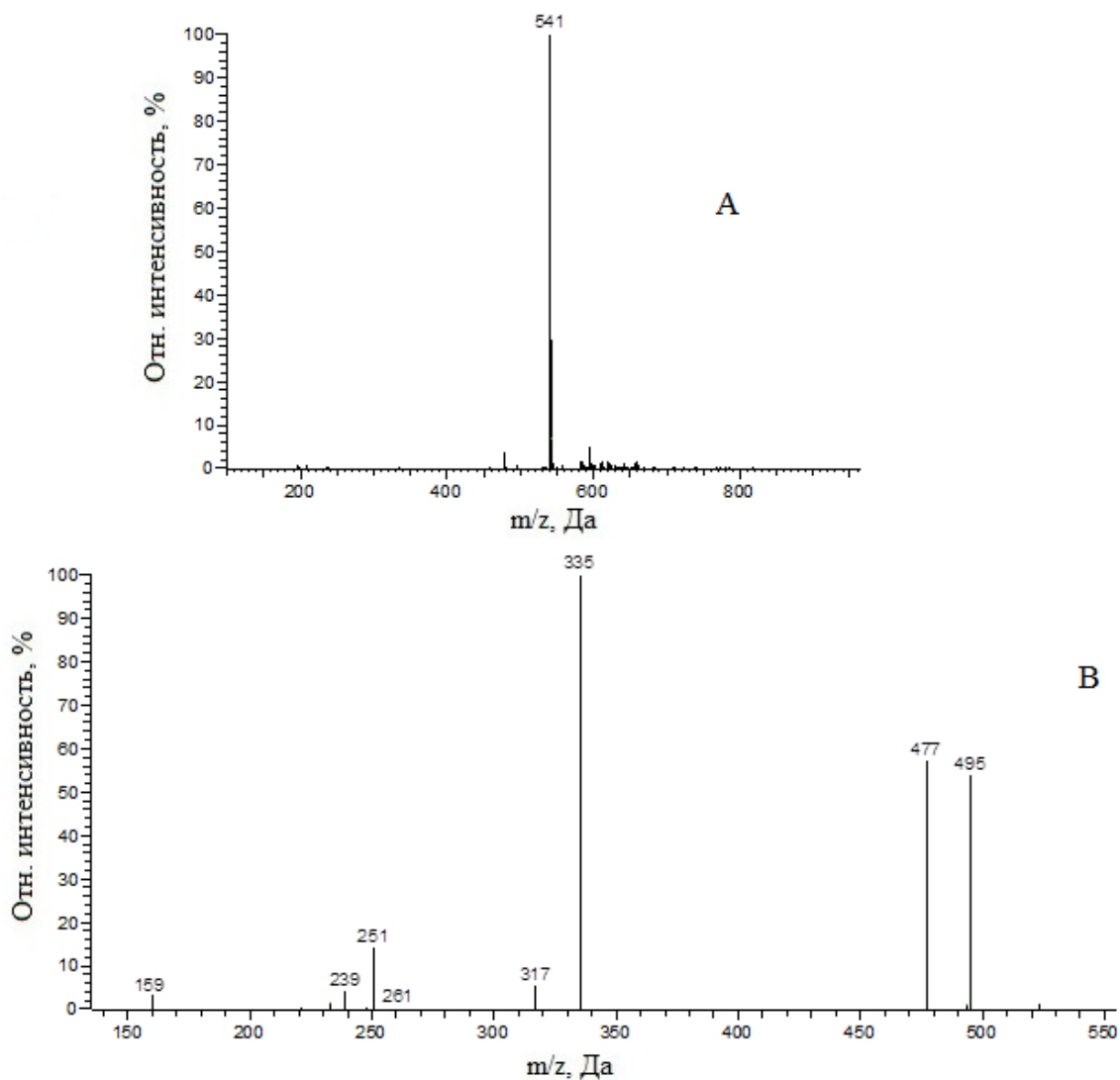


Рис. 24. Масс-спектры (низкого разрешения) туркестерона: в режиме сканирования отрицательных ионов (А) и тандемный (В) (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 525.3, энергия в соударительной ячейке 30 эВ)

* * *

Таким образом, в ходе исследования соединений класса фитостероидов методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения разработан подход к их экспрессной идентификации в образцах сложного состава, таких как растительные экстракты и лекарственные препараты. Алгоритм отнесения неизвестного соединения к рассматриваемому классу соединений включает следующие шаги:

- 1) регистрация масс-спектра второго порядка неизвестного соединения;
- 2) поиск в спектре m/z характеристичных ионов-продуктов класса фитостероидов (табл. 4);

3) сравнение экспериментально полученных точных значений m/z и брутто-формул с аналогичными параметрами стандартных образцов фитостероидов (могут быть получены масс-спектры доступных стандартов или взяты уже полученные в данной работе МС/МС-спектры экдистена и туркестерона);

4) поиск и соотнесение m/z $[M+HCOOH-H]^-$, $[M-H]^-$, $[M-H_2O-H]^-$ и т.д., а также бокового радикала при С-17 для неизвестного соединения и стандартов;

5) выводы о строении исследуемого аналита, а в случае подтверждения его принадлежности к классу фитостероидов – поиск возможной структуры по литературным данным.

Таблица 6. Экспериментально полученные значения точных масс ионов $[M-H]^-$ и $[M+HCOOH-H]^-$

Аналит	$[M-H]^-$, Да	$[M+HCOOH-H]^-$, Да	Значения m/z характеристичных ионов, Да
Экдистен	479.30167	525.30676	301 и 319
Туркестерон	495.29639	541.30176	317 и 335
Макистерон А	493.31732	539.32270	301 и 319
Экдизон	463.30673	509.31208	301 и 319
Дакрихайнанстерон	461.29118	507.29635	301 и 319
Макистерон С	507.33276	553.33862	301 и 319
Аюгастерон С	479.30167	525.30676	317 и 335

Такой подход позволяет экспрессно идентифицировать соединения класса фитостероидов в образцах сложного состава без их препаративного выделения и установления точной структуры, в частности, методом ЯМР (1H , ^{13}C). Предложенный алгоритм не заменяет метод ЯМР, т.к. не позволяет однозначно определить структуру, однако может быть использован для предварительного обнаружения фитостероидов в образце и определения содержания каждого в отдельности.

В литературе МС/МС-спектры фитостероидов встречаются редко [105] и получают их только на приборах низкого разрешения; в единичных работах [121] описаны их масс-спектры первого порядка высокого разрешения. Однако при работе с такими сложными объектами, как растительные экстракты, содержащие большое число различных классов соединений, для идентификации целевых

аналитов (при отсутствии подтверждения методом ЯМР) необходимо использовать масс-спектрометрию высокого разрешения. В отличие от описанных в литературе методик идентификации, в нашем случае нет необходимости ни выделять каждый фитостероид в отдельности для подтверждения его структуры, ни иметь в наличии весь спектр стандартов фитостероидов, достаточно всего лишь нескольких (1-2) стандартных образцов. Отметим, что имеется лишь ограниченное количество коммерчески доступных стандартных образцов фитостероидов, а при высокой стоимости каждая ампула содержит лишь 0.5 – 1 мг вещества.

При наличии в литературе необходимых дополнительных сведений о структурах изученных фитостероидов можно на основании данных ВЭЖХ-МС/МС с высокой достоверностью определить строение аналита. Кроме того, систематическое изучение механизма фрагментации ионов-предшественников до характеристичных ионов-продуктов соединений этого класса позволит перенести данную методику на МС-приборы низкого разрешения как наиболее доступные и часто встречающиеся в аналитических лабораториях. Разработанный алгоритм идентификации фитостероидов может быть эффективно использован в рутинном контроле качества растительного сырья, являющегося основой для фармпрепаратов и биологических добавок, так как позволяет определять количество, суммарное содержание и соотношение концентраций биологически активных соединений.

* * *

Тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения – мощный современный метод идентификации и определения низкомолекулярных органических соединений в сложных смесях, например, фитостероидов в растительных экстрактах и фармпрепаратах. Однако в лабораториях чаще используют флуоресцентное и радиоиммунное определение фитостероидов, а также масс-спектрометрию низкого разрешения. Если для использования последнего метода может быть адаптирован описанный нами выше алгоритм, то остальные методы требуют предварительного селективного извлечения и концентрирования фитостероидов. Подходом к селективному выделению группы аналитов из образцов сложного состава может служить молекулярный импринтинг. Получению молекулярных отпечатков фитостероидов в различных матрицах и посвящены следующие главы.

III.2. Выбор систем для поверхностного импринтинга фитостероидов

Молекулярный импринтинг – полимеризация функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекулы-шаблона (темплата). Принято считать, что после удаления темплата из полимерной стуртуры в ней остается полость, по форме и размеру соответствующая темплату (отпечаток). Этот метод позволяет получать селективные сорбенты для выделения и концентрирования аналитов (в том числе групп родственных соединений) из матриц сложного состава. Количественной характеристикой эффективности импринтинга и мерой качества молекулярных отпечатков служит *импринтинг-фактор*, представляющий собой отношение:

$$ИФ = \frac{C_{импринт}}{C_{контр}}, \text{ где } C_{импринт} - \text{какая-либо количественная характеристика}$$

импринтированного сорбента (например, процент сорбции темплата), $C_{контр}$ – то же для контрольного (неимпринтированного) сорбента.

В молекулярном импринтинге используют понятия матрицы и подложки. *Матрица* – вещество, в котором формируется отпечаток темплата (основной компонент импринтированного слоя). Она может быть закреплена на подложке. *Подложка* – основа для закрепления импринтированного слоя; она может представлять собой пористую пленку (мембрану), твердые частицы (сорбент) и т. п.

В литературе нет сведений о получении молекулярных отпечатков фитостероидов. Не существует и алгоритм, позволяющий однозначно выбрать наилучшую матрицу для конкретного аналита или класса веществ. Поэтому при выборе систем для импринтинга фитостероидов мы исходили из литературной информации о том, что для аналитов различной природы наиболее воспроизводим импринтинг в такие матрицы, как акриловые мономеры, силикагель и диоксид титана(IV). В то же время, наименее трудоемок импринтинг в слои полиэлектролитов.

Матрицу часто наносят на подложку тонким слоем, реализуя *поверхностный импринтинг*, который позволяет минимизировать проблемы, связанные с глубоким расположением отпечатков.

Матрицы различной природы, используемые в молекулярном импринтинге отличаются по жесткости атомно-молекулярной структуры, окружающей молекулу

темплата и сохраняющей отпечаток после его удаления. В работе мы изучили как самую простую в технике получения и одновременно конформационно гибкую матрицу (слои полиэлектролита, в том числе белка), так и весьма жесткую – неорганический оксид (TiO_2).

III.2.1. Полиэлектролитный мультислой на лавсановой мембране

Для создания селективных сорбентов и мембран используют молекулярный импринтинг, к простейшим вариантам которого относится импринтинг в полиэлектролитные мультислои (ПЭМ) [5–15]. ПЭМ формируются без образования ковалентных связей, что значительно упрощает методику молекулярного импринтинга по сравнению с методом традиционной полимеризации акриловых мономеров. В то же время, сформированные ПЭМ могут быть при необходимости ковалентно сшиты различными способами. В литературе есть данные об успешном импринтинге некоторых соединений в ПЭМ [5, 9–12], хотя рутинным такой способ импринтинга пока не стал.

Работу по получению молекулярных отпечатков эйдистена начали с выяснения возможности импринтинга в ПЭМ. Нужно было выбрать подходящие полиэлектролиты, изучить возможность нанесения ПЭМ на подходящую подложку, выбрать способ контроля нанесения слоев, изучить возможность использования органического растворителя, менее сольватирующего, чем вода, по отношению к темплату, и влияние сшивания мультислоев на качество получаемых молекулярных отпечатков.

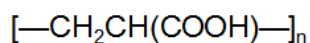
а) Контроль нанесения полиэлектролитов на мембрану

Импринтинг в полиэлектролитный мультислой включает послойное нанесение разноименно заряженных полимеров в присутствии темплата, который затем удаляется. Схема и последовательность стадий такого импринтинга приведены на рис. 1.

В качестве подложки для полимерных слоев использовали полиэтилентерефталатную трековую мембрану, которая обладает регулярной поровой структурой, имеет узкое распределение пор по размерам, совместима с органическими растворителями и сорбирует полиэлектролиты [17–19].

По литературным данным, к наиболее часто используемым для импринтинга в мультислои полиэлектролитам относятся полиакриловая кислота (ПАК) и гидрохлорид полиаллиламина (ПААГХ) [5] (рис. 25).

Полиакриловая кислота (ПАК)



Полиаллиламин гидрохлорид (ПААГХ)

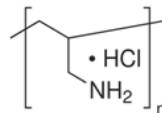


Рис. 25. Структурные формулы используемых в работе полимеров: полиакриловой кислоты и гидрохлорида полиаллиламина

Мембрану модифицировали в диффузионной ячейке, показанной на рис. 13 (см. главу II.3.1), в качестве питающего раствора использовали раствор полиэлектролита соответствующего заряда, принимающим был чистый растворитель. Использовали метод послойного нанесения, в результате которого слой полиэлектролита образуется на поверхности мембраны и в ее порах. Применяя эту процедуру несколько раз, осаждали необходимое число слоев полиэлектролитов.

Следовало убедиться, что полиэлектролиты удерживаются на поверхности пор. Нанесение полиэлектролитов на мембрану контролировали следующими способами.

1. Метод ИК-спектроскопии оказался недостаточно чувствителен (спектры мембран с ПЭМ и без них были идентичны).

2. Измеряли углы смачивания мембран, которые меняются в результате нанесения полимеров, в том числе из этанольных растворов, как показано в табл. 7.

3. Измеряли скорость фильтрации растворителей через мембраны. Мембрану помещали в шприцевую насадку и прокачивали воду или этанол, собирая фильтрат. (Прокачивали вручную, используя тот факт, что при малом размере пор (0.12 мкм) скорость вытекания растворителя мало зависит от колебаний прикладываемого давления.) Оказалось, (табл. 8), что скорости фильтрации растворителей через модифицированные и немодифицированные мембраны резко различаются.

Таблица 7. Углы смачивания трековой мембраны водой (градусы)

Полиэлектролит-модификатор	Растворитель, из которого сорбировали полиэлектролит	
	Вода	Этанол
ПААГХ	64	56
ПАК	60	58
1) ПААГХ, 2) ПАК	50	62
Нет	45	

Результаты изучения углов смачивания и фильтрации растворителей позволяют считать, что мембраны, через которые проводили диффузию полиэлектролитов, действительно удерживают в своих порах полиэлектролиты, причем поры перекрыты не полностью и через них возможна диффузия.

Таким образом, трековые ПЭТФ мембраны могут быть использованы для нанесения слоев полиэлектролитов с целью получения в их матрице молекулярных отпечатков темплата.

Таблица 8. Скорости фильтрации растворителей через трековую мембрану (n=3, P=0.95)

Мембрана	Скорость фильтрации, мл/с	
	этанола	воды
Немодифицированная	0.20 ± 0.03	0.05 ± 0.01
Модифицированная двумя слоями ПААГХ + ПАК	0.08 ± 0.02	0

б) Изучение факторов, влияющих на эффективность поверхностного импринтинга

Возможность получения молекулярных отпечатков при импринтинге низкомолекулярных органических соединений в полиэлектролитные мультислой и влияние различных факторов на импринтинг оценивали на примере пенициллина V (рис. 26).

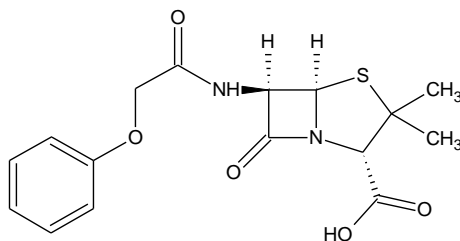


Рис. 26. Пенициллин V.

С этой целью мембраны модифицировали нанесением полимеров из растворов, содержащих полиэлектролиты и темплат. Оказалось, что уже после нанесения единственного бислоя (ПААГХ и ПАК) импринтированная и неимпринтированная мембраны приобретают различные свойства. Кривые зависимости диффузии пенициллина от времени через такие мембраны приведены на рис. 27, из которого видно, что импринтированные мембраны более проницаемы по отношению к темплату при всех изученных временах его диффузии (от 1 до 10 мин), что можно объяснить только образованием молекулярных отпечатков темплата в полиэлектролитном слое. Максимальное различие наблюдали при модифицировании в течение 4 мин. Увеличение продолжительности нанесения полиэлектролитов (7, 15 и 30 мин) не улучшает качество отпечатков. При нанесении полиэлектролитов в течение 1 ч образуются не проницаемые по отношению к пенициллину мембраны (вероятно, за такое время поры полностью перекрываются полиэлектролитным комплексом).

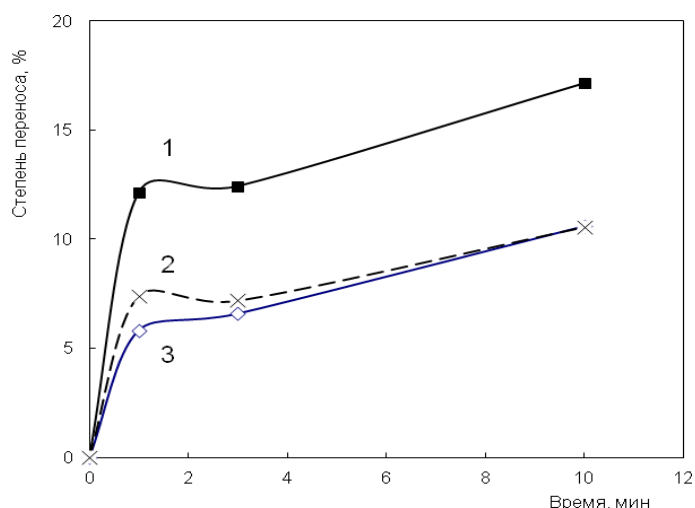


Рис. 27. Степень переноса пенициллина V в зависимости от времени через мембраны: модифицированную полиэлектролитами в присутствии пенициллина V (1), немодифицированную (2) и модифицированную в отсутствие пенициллина (3). Полиэлектролиты наносили на мембрану из 0.01 М раствора в этаноле (91%-го для полиаллиламина и 96%-го для полиакриловой кислоты) в течение 4 мин. Приведены средние степени переноса для двух параллельных мембран.

По литературным данным [14, 15], проницаемость полимерных мультислоев можно регулировать добавлением электролитов в раствор, из которого осаждается полиэлектролит. Это позволяет также влиять на специфичность связывания и стабилизацию взаимодействия полимера с темплатом [15]. В связи с этим полиэлектролиты сорбируют из водных растворов обычно в присутствии солей (ионная сила 0.1–2 М) [14]. Мы предположили, что при нанесении полиэлектролитов из органического растворителя результаты также будут зависеть от ионной силы. Для создания ионной силы в водных растворах добавляли NaCl. В случае органического растворителя (этанола) применение неорганических солей невозможно, поэтому использовали ионную жидкость (ИЖ) – тетрафторборат 1-бутил-3-метилимидазоль [BMIm][BF₄], как наиболее доступную. Структурная формула ИЖ представлена на рис. 28. ИЖ вводили в растворы как катионного, так и анионного полиэлектролитов при их нанесении на мембрану.

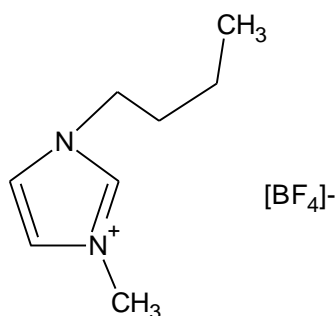


Рис. 28. Структурная формула ионной жидкости [BMIm][BF₄] (тетрафторборат 1-бутил-3-метилимидазолия)

В отсутствие ИЖ проницаемость полученной импринтированной мембраны ниже, чем контрольной (рис. 29), тогда как в присутствии ИЖ резко возрастает проницаемость импринтированной мембраны. Таким образом, при формировании молекулярных отпечатков пенициллина V в растворы полиэлектролитов целесообразно вводить ионную жидкость в концентрации порядка 0.1 М.

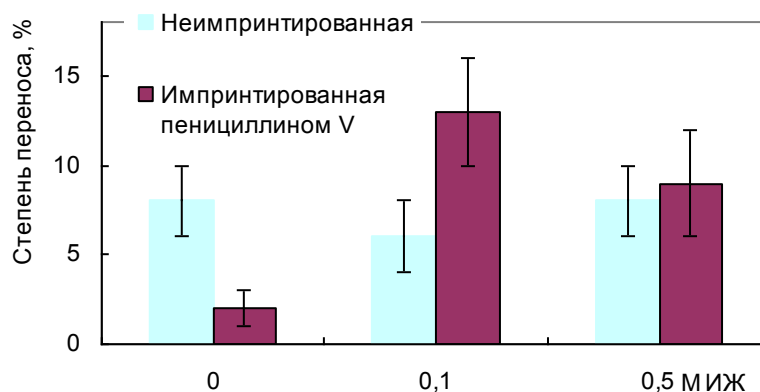


Рис. 29. Влияние концентрации ионной жидкости, из раствора которой наносили полиэлектролиты, на степень переноса пенициллина V (%) через модифицированные мембраны ($n = 3$, $P = 0.95$). Мембраны модифицировали полиэлектролитами в течение 4 мин, продолжительность диффузии пенициллина V составляла 3 мин.

При добавлении 0.1М ионной жидкости в раствор наносимых полиэлектролитов проницаемость мембраны с молекулярными отпечатками пенициллина V была максимальной (степень переноса 58%, рис. 30) и отличалась от проницаемости контрольной мембраны (степень переноса 21%, рис. 30). При повышении содержания ИЖ до 0.5М отличия в проницаемостях контрольной и импринтированной мембран становились малы (3–4 %), т.е. молекулярные отпечатки не образовывались.

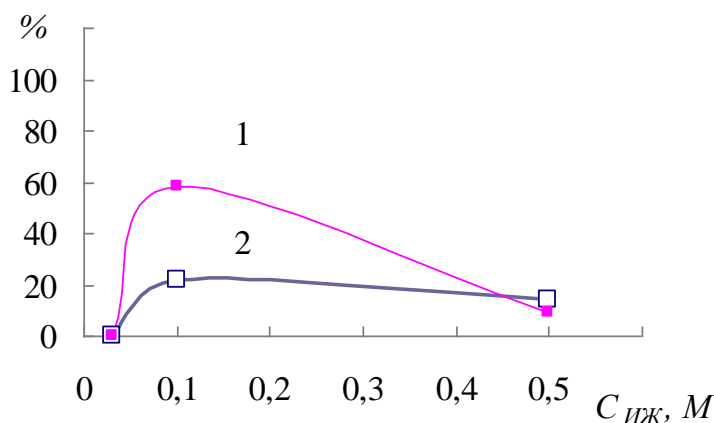


Рис. 30. Степень переноса пенициллина (%) через мембрану, модифицированную в присутствии $[BMIm][BF_4]$, в зависимости от концентрации ИЖ (время диффузии – 3 мин): 1 – для импринтированной мембраны, 2 – для контрольной мембраны.

Стабильные мультислои с молекулярными отпечатками, согласно литературным данным [4], могут быть получены путем ковалентной сшивки слоев полимеров с включенным темплатом. Такой подход обеспечивает фиксацию молекулярных отпечатков в мультислойных структурах, хотя селективность, а также механизмы и условия, при которых возможен такой импринтинг, требуют дальнейшего улучшения. Поэтому для улучшения свойств мембраны слой полимера сшивали с использованием термической сшивки или сшивающих агентов.

На примере пенициллина V в качестве темплата показано, что отличие в степенях переноса через импринтированную и контрольную мембраны действительно достигается при использовании термической сшивки, что следует из результатов, приведенных в табл. 9. Степень переноса пенициллина через сшитую импринтированную мембрану ниже, чем через контрольную или импринтированную несшитую, что мы связываем с увеличением сорбции темплата такой мембраной.

Таблица 9. Степень переноса пенициллина V (%) при времени диффузии 3 мин (мембраны получены в присутствии 0.1 М ИЖ)

Мембрана	%
Импринтированная	58
Импринтированная, сшитая	5
Контрольная	22
Контрольная, сшитая	11

Таким образом, показана возможность нанесения полиаллиламина и полиакриловой кислоты на трековую мембрану из 91–96%-го этанола и образование селективных молекулярных отпечатков пенициллина V в полученном бислое. Импринтинг следует проводить в присутствии ионной жидкости (0.1 М). Показано, что способ сшивки полиэлектролитных слоев влияет на отличие импринтированной мембраны от контрольной, в случае темплата пенициллина V при сшивке уменьшается их проницаемость.

в) Получение молекулярных отпечатков эрдистена

На первом этапе выяснения возможности получения молекулярных отпечатков эрдистена проверяли применимость для него методики импринтинга в полимерные мультислои из водного раствора. Полученная таким образом мембрана (нанесен бислой полимеров ПААГХ и ПАК из водного раствора в присутствии темплата эрдистена) с молекулярными отпечатками проницаема для модельного раствора эрдистена, хотя степень переноса невелика (3% при диффузии эрдистена в течение 3 мин). Вода относится к сильно сольватирующим растворителям, что должно снижать качество получаемых отпечатков при нанесении слоев полимеров с темплатом из воды, поэтому импринтинг эрдистена изучали в среде органического растворителя. При использовании ДМСО и ДМФА их УФ-спектр накладывался на спектр эрдистена, затрудняя его контроль, а используемые полимеры недостаточно хорошо растворялись в них. Поэтому далее использовали этанольные растворы полимеров, из которых, как показано ранее, возможно нанесение полиэлектролитных слоев (раздел III.2.1.a). В качестве исходных условий получения импринтированных эрдистеном мембран выбрали те, которые были оптимальными для пенициллина V.

Как видно по величинам степеней переноса эрдистена при диффузии через полученные мембраны и по содержанию эрдистена в мембране, оцененному по его содержанию в растворе после десорбции с мембраны (табл. 10), молекулярные отпечатки эрдистена в полиэлектролитном слое не образуются.

Таблица 10. Диффузия эрдистена через несшитую модифицированную мембрану (2 слоя полиэлектролитов, 0.1 М ИЖ) при различных временах диффузии

Мембрана	Степень переноса эрдистена, % от исходного количества		Содержание эрдистена в мембране, определенное путем отмывки мембраны после диффузии, % от исходного количества	
	3 мин	7 мин	3 мин	7 мин
Импринтированная	5.5	5	1	2
Контрольная	7	—*	1	1.5

* Не исследовано

Мы предположили, что сшивка (термическая или с использованием сшивающих агентов) слоев полиэлектролитов поможет получить отпечаток экдистена в мультислоях. При термической сшивке (образовании амидных связей между цепями ПАК и ПААГХ) проницаемость импринтированной мембраны осталась такого же порядка, как и для мембраны без сшивки (табл. 11).

Таблица 11. Диффузия экдистена через термически сшитую модифицированную мембрану (1 бислой ПААГХ/ПАК, 0.1 М ИЖ) и мембрану без сшивки при различных временах диффузии

Мембрана	Степень переноса экдистена, %		
	15 сек	3 мин	7 мин
Импринтированная (со сшивкой)	5	6	8
Импринтированная (без сшивки)	-	5.5	5

В связи с этим исследовали возможность химической сшивки, используя в качестве сшивающих агентов глутаровый диальдегид или эпихлоргидрин (рис. 31).

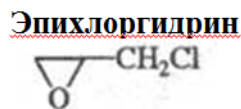
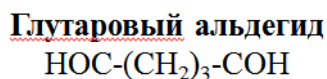


Рис. 31. Структуры сшивающих агентов

Таблица 12. Диффузия экдистена через мембрану со слоями полимеров, сшитыми с использованием глутарового альдегида (0.5% этанольный раствор) ($n = 3$, $P = 0.95$).

Мембрана	Время сшивки – 15 мин			Время сшивки – 2 часа		
	Степень переноса, %					
	15 сек	3 мин	7 мин	15 сек	3 мин	7 мин
Импринтированная	-	6 ± 3	-	0	5 ± 3	5
Контрольная	1.6	2 ± 1	1.6	0	0	5

Примечание: «-» не исследовали

При сшивке глутаровым альдегидом в течение 2 ч видно различие в степенях переноса через контрольную и импринтированную мембраны (табл. 12). При использовании в качестве сшивающего агента эпихлоргидрина также заметно

различие импринтированной и контрольной мембран при времени диффузии до 3 мин (табл. 13).

Таблица 13. Сшивка слоев полимеров с использованием эпихлоргидрина (0.5% этанольный раствор), время сшивки – 15 мин ($n = 3, P = 0.95$)

Мембрана	Степень переноса, %		
	15 сек	3 мин	7 мин
Импринтированная	6	5.5 ± 3.6	5
Контрольная	3.4	2.0 ± 1.5	6

Таким образом, при работе методом ПЭМ показана возможность нанесения полиэлектролитных слоев из этанола на трековую мембрану. Введение ионной жидкости в растворы, из которых осаждают полиэлектролиты, позволяет получить более проницаемые мембраны.

При использовании ковалентной сшивки слоев полимеров, нанесенных на мембрану, наблюдали эффект импринтинга (проницаемость импринтированной мембраны была выше или ниже, чем контрольной). Для получения отпечатков экдистена химическая сшивка (глутаровым альдегидом и эпихлоргидрином) оказалась более перспективной, чем термическая. Как видно из табл. 11, импринтинг-фактор, оцененный как отношение степеней переноса экдистена через импринтированную и неимпринтированную мембраны, составляет 5.0. Однако, воспроизводимость получения отпечатков данным методом низкая.

В целом же импринтинг экдистена в полиэлектролитные мультислои оказался малоэффективным: малы были как степень переноса темплата, так и воспроизводимость скоростей его переноса через импринтированные мембраны.

Далее мы увеличи функциональных групп в полимере, используемом для импринтинга (перейдя к полипептиду и белку), а также закрепили эту полимерную матрицу на более жесткой подложке, чтобы ограничить ее конформационную гибкость (перейдя к силикагелю в качестве подложки).

III.2.2. Аминокислоты и белок на силикагеле

В литературе есть данные о получении молекулярных отпечатков органических соединений в матрице полиэлектролитов, закрепленных на поверхности твердого носителя за счет электростатических взаимодействий [2–4, 8, 15]. Опираясь на эту информацию, попытались использовать силикагель в качестве подложки для получения отпечатков экдистена в полиэлектролитных мультислоях.

Предварительные исследования показали низкую эффективность слоев полиаллиламина и полиакриловой кислоты как импринтированных матриц для соединений группы экдистена на лавсановой мембране, поэтому в качестве полиэлектролитов далее изучали полипептиды.

а) Получение отпечатков экдистена в слое полилейцина

Согласно литературным данным по импринтингу эстрадиола (стероид животного происхождения), полиэлектролитная матрица для молекулярных отпечатков может быть сформирована путем поликонденсации смеси аминокислот, подобной аминокислотному составу бычьего сывороточного альбумина (БСА) [129, 130]. Мы попытались получить молекулярные отпечатки экдистена, используя вместо такой смеси аминокислот лейцин (он преобладает в смеси, используемой в методике [129, 130]). Импринтинг проводили по методике 8, пункт III.3.2.а.

Таблица 14. Сорбционные свойства образцов «силикагель – лейцин» по отношению к экдистену (в расчете на 1 мг SiO₂)

Образец силикагеля	Количество сорбированного экдистена на 1 мг SiO ₂ , мкг
Контрольный	0.10
Импринтированный	0.09

Импринтированные экдистеном образцы, содержащие слои поликонденсированного лейцина, закрепленного на поверхности силикагеля, сорбировали около 40% (от исходного количества) экдистена, однако сорбционная емкость в расчете на 1 мг силикагеля оказалась невысокой (табл. 14), а сорбция контрольным образцом не отличалась от сорбции импринтированным. Таким

образом, получить молекулярные отпечатки экдистена на этом сорбенте не удалось, что может быть связано с отсутствием предкомплекса лейцина с темплатом (эkdистеном).

В работах [129, 130] для получения молекулярных отпечатков использовали смесь аминокислот, аналогичную по своему составу белку (БСА), поэтому мы предположили, что в качестве полиэлектролита в молекулярном импринтинге экдистена можно использовать сам белок. Белок обладает различными функциональными группами, что также могло бы повысить качество молекулярных отпечатков за счет координирования молекул темплата по этим группам.

б) Получение отпечатков экдистена в слое белка

Сорбенты с молекулярными отпечатками экдистена в слое БСА, закрепленного на поверхности силикагеля, получали по методикам 4 – 7 П.3.2.а.

• *Контроль модификации силикагеля белком*

Предварительно с использованием метода рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) изучили закрепление белка на поверхности силикагеля. Определяли количество привитого БСА в зависимости от его конформации: нативная (натБСА), а также после восстановления и алкилирования –S-S- мостиков (дБСА); а также от способа закрепления БСА на поверхности силикагеля (ковалентное / нековалентное) (табл. 15).

Таблица 15. Количество БСА, нанесенного на 1 мг SiO₂ (по данным РФА*)

Образец БСА	Ковалентная пришивка	Нековалентное закрепление
дБСА	1.3	3.3
натБСА	0.4	0.7

* РФА проведен к.х.н. М.А.Статкусом

Максимальное количество БСА удалось нанести на поверхность частиц SiO₂ путем нековалентного закрепления денатурированного белка. Для ковалентно пришитых образцов количество денатурированного белка на поверхности было в 2.5 раза меньше, а в наименьшей степени закрепить на твердом носителе удастся нативный белок.

- *Сорбция экдистена на импринтированном силикагеле*

Количество сорбированного экдистена определяли по разности его содержания в растворе на единицу массы сорбента до и после сорбции (табл. 16). Образцы с нековалентным закреплением белка на поверхности силикагеля сорбируют аналит в значительно большей степени, чем образцы с ковалентной пришивкой. В случае использования денатурированного альбумина нековалентно модифицированный образец с молекулярными отпечатками удерживает в 2 раза больше экдистена по сравнению с контрольным образцом, что доказывает образование специфичных сайтов связывания в матрице полиаллиламина и белка.

При ковалентной сшивке альбумина с твердым носителем количество сорбированного аналита мало вне зависимости от конформации используемого при синтезе белка.

Таблица 16. Сорбция экдистена образцами «силикагель – БСА» (в расчете на 1 мг SiO₂)

Вид закрепления БСА	Образец БСА	Сорбент	
		Контрольный	Импринтированный
		Количество сорбированного экдистена на 1 мг SiO ₂ , мкг	
Ковалентная пришивку	дБСА	0.07	0.06
	натБСА	0.06	0.06
Нековалентное закрепление	дБСА	0.24	0.43
	натБСА	0.23	0.17

Факт максимальной сорбции экдистена образцом с нековалентным закреплением денатурированного альбумина согласуется с количеством нанесенного белка, которое для этого способа закрепления белка максимально (табл. 15), а значит, и молекулярных отпечатков может образоваться больше.

- *Групповая сорбция фитостероидов при анализе растительного экстракта*

Далее использовали полученный сорбент для выделения основных компонентов (экдистена и экдизона) и минорных фитостероидов из экстракта серпухи венценосной. Обнаружили групповую сорбцию фитостероидов из такого экстракта (рис. 32). При этом степень сорбции как основных (экдизона и экдистена), так и минорных фитостероидов (туркестерона, макистерона С, дакрихайнанстерона) оказалась значительно выше в случае образцов с молекулярными отпечатками, чем без них, что показывает наличие сайтов селективного связывания этой группы аналитов. Особенность полученных сорбентов заключается в том, что, импринтированные только экдистеном, они проявляют свойство групповой сорбции по отношению к соединениям того же класса.

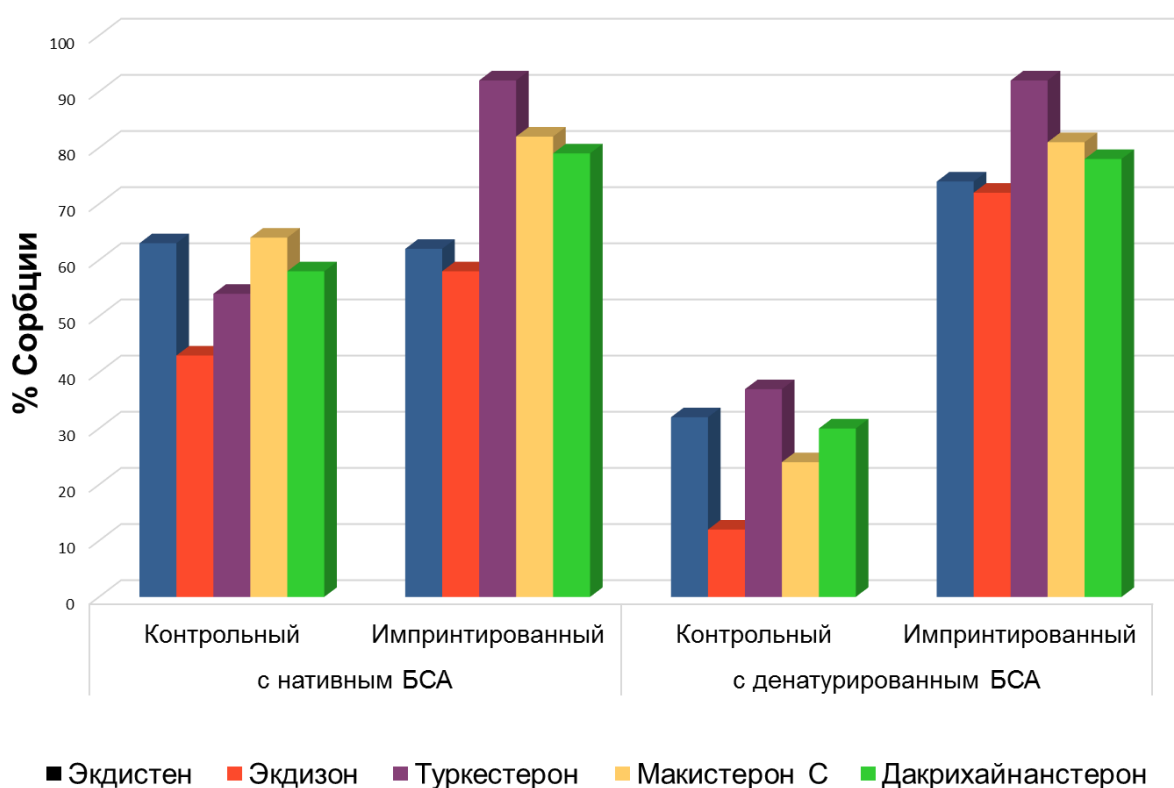


Рис. 32. Степень сорбции (%) фитостероидов из экстракта серпухи венценосной (*Serratula coronata*) сорбентами на основе силикагеля с нековалентно закрепленным дБСА с молекулярными отпечатками и без них.

Однако воспроизводимость сорбционных свойств разных партий полученных сорбентов оказалась низкой, что не позволило признать их пригодными для сорбции фитостероидов из реальных объектов. Возможно, это связано со сложностью совмещения поверхностного привитого белкового слоя на силикагеле с органической средой, из которой проводили сорбцию.

Таким образом, мы изучили возможность импринтинга экдистена в конформационно гибких матрицах (полиэлектrolитном мультислое и белке),

закрепленных различными способами на различных подложках (трековой мембране и силикагеле). Полученные при этом молекулярные отпечатки позволили наблюдать групповую сорбцию фитостероидов, однако нестабильность получаемых результатов заставила нас заменить матрицу на более конформационно жесткую.

III.2.3. Гель TiO_2 на частицах TiO_2

Общий подход к созданию «жесткой» матрицы для молекулярного отпечатка мог бы заключаться в формировании неорганического полимера (SiO_2 или TiO_2) вокруг молекул темплата на неорганической подложке того же состава (SiO_2 или TiO_2). Однако молекулы темплата не могут проникать внутрь такой неорганической матрицы в отличие от органополимерной, т.е. молекулярные отпечатки образуются только на ее поверхности. В связи с этим мы предприняли попытку не только получить такие поверхностные отпечатки, но и «достроить» их прививаемыми к поверхности полимерными цепями с функциональными группами, которые также могли бы дополнительно координироваться с молекулами темплата, способствуя его селективному связыванию.

Поэтому следующим этапом нашей работы был импринтинг экдистена на поверхности наночастиц диоксида титана, на которые наносили дополнительный тонкий слой TiO_2 путем гидролиза *n*-бутоксиды титана по методу Кунитакэ [92], а затем прививали поверхностные группы (по трем различным методикам [123–126]) для «достройки» отпечатка (схема 3).

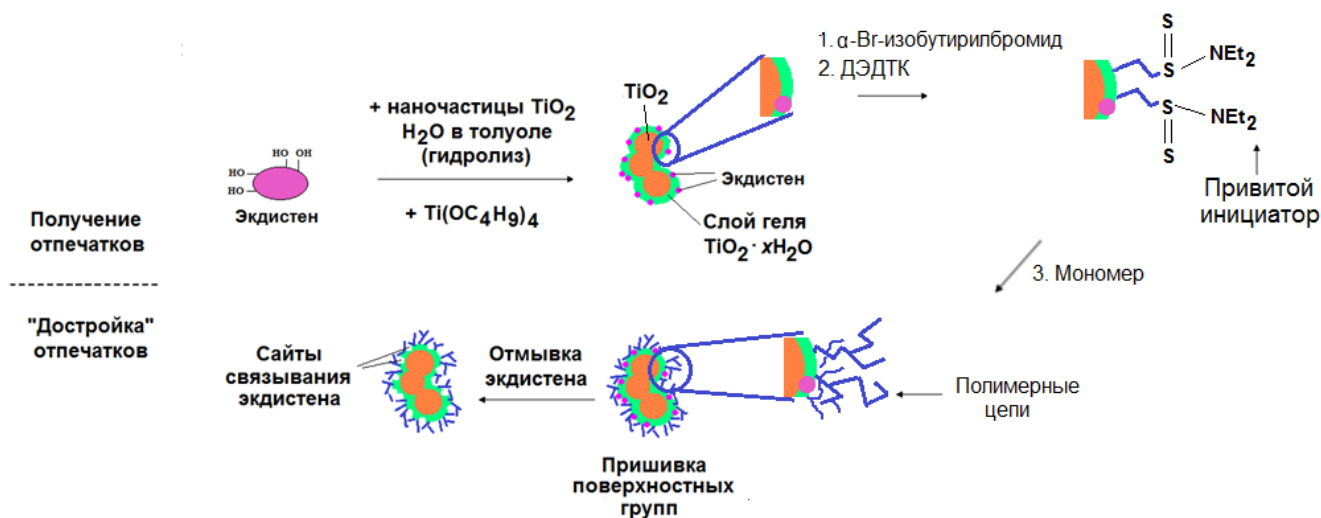


Схема 3. Получение и «достройка» молекулярных отпечатков на поверхности наночастиц диоксида титана.

а) *Выяснение возможности получения комплекса экдистена с 3-аминофенилборной кислотой*

Для повышения качества молекулярных отпечатков темплат иногда вводят в виде комплексов [5]. Мы предположили, что добавление к структуре фитостероида ионизирующей группы будет способствовать более сильному взаимодействию темплата с матрицей за счет образования более прочных водородных связей. С этой целью мы изучили возможность импринтинга экдистена в форме соединений с 3-аминофенилборной кислотой (АФБК), содержащей катиногенную группу (аминогруппу), а также с 3-карбокси-5-нитрофенилборной кислотой (КНФБК), образующей, наоборот, анион. Как показал эксперимент, отпечатки экдистена в TiO_2 образуются только при использовании самого экдистена или его соединения с АФБК (схема 4). Возможно, отсутствие импринтинга в присутствии КНФБК вызвано тем, что последняя, как кислота, частично разрушает бутаоксид титана, переводя его в бутанол.

Методом нормально-фазовой ВЭЖХ исследовано комплексообразование экдистена с АФБК (табл. 17). Времена удерживания экдистена в присутствии и в отсутствие АФБК различаются, что подтверждает образование комплекса экдистен – АФБК в среде изопропанола. Добавление к этой смеси *n*-бутаоксида титана не приводит к изменению времен удерживания, то есть комплекс экдистена с бутаоксидом неустойчив или вовсе не образуется.

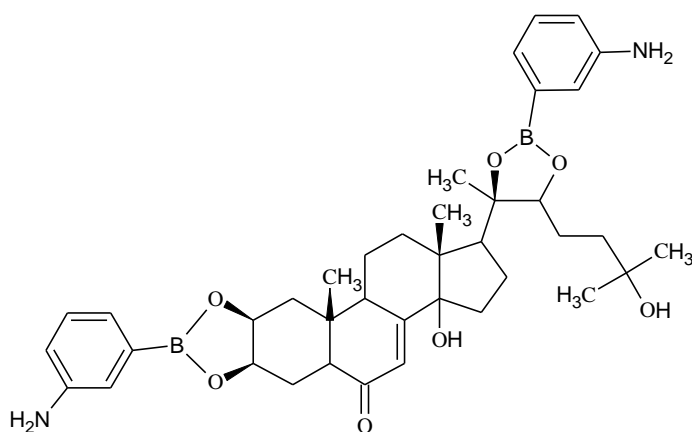


Схема 4. Предполагаемая структура комплекса экдистена с 3-аминофенилборной кислотой.

Таблица 17. Исследование взаимодействия экдистена с буюксидом титана(IV) и 3-аминофенилборной кислотой методом нормально-фазовой ВЭЖХ (концентрация каждого из компонентов – $5 \cdot 10^{-4}$ М)

Состав раствора, вводимого в колонку [последовательность смешения]	Времена удерживания пиков, мин
Экдистен	2.88
Экдистен + АФБК	3.16
Бутоксид титана(IV)	2.43
Экдистен + буюксид титана(IV)	2.87; 2.44
[Экдистен + буюксид] + АФБК	2.45; 3.16
[Экдистен + АФБК] + буюксид	2.45; 3.16

б) Контроль модифицирования поверхности частиц TiO_2 дополнительным слоем TiO_2 и поверхностными группами

Получены ИК-спектры (рис. 33, 34) и фотографии в просвечивающем электронном микроскопе синтезированных сорбентов (рис. 35). Отличия ИК-спектров диоксида титана, модифицированного золь-гель методом, и немодифицированного носителя вызваны сохранением остаточных буюкси-групп в глубине этого слоя [131] (рис. 33). Дальнейшую пришивку поверхностных групп нескольких видов (схемы 5, 6, 7) осуществляли по методикам 12, 13, 14 (см. Экспериментальную часть). В ИК-спектрах импринтированных частиц TiO_2 (рис. 34), дополнительно модифицированных на поверхности, присутствуют полосы поглощения Si-O ($1200-1500\text{ см}^{-1}$); CH_2 (1425 см^{-1}), C-N (1350 см^{-1}); в области $1500-1700\text{ см}^{-1}$ наблюдаются полосы C=O (валентн.), C-N (валентн.), N-H (деформац. плоскостные), а в области $3100-3500\text{ см}^{-1}$ – полосы NH_2 , NH и N- CH_3 (в различных кислородосодержащих соединениях).

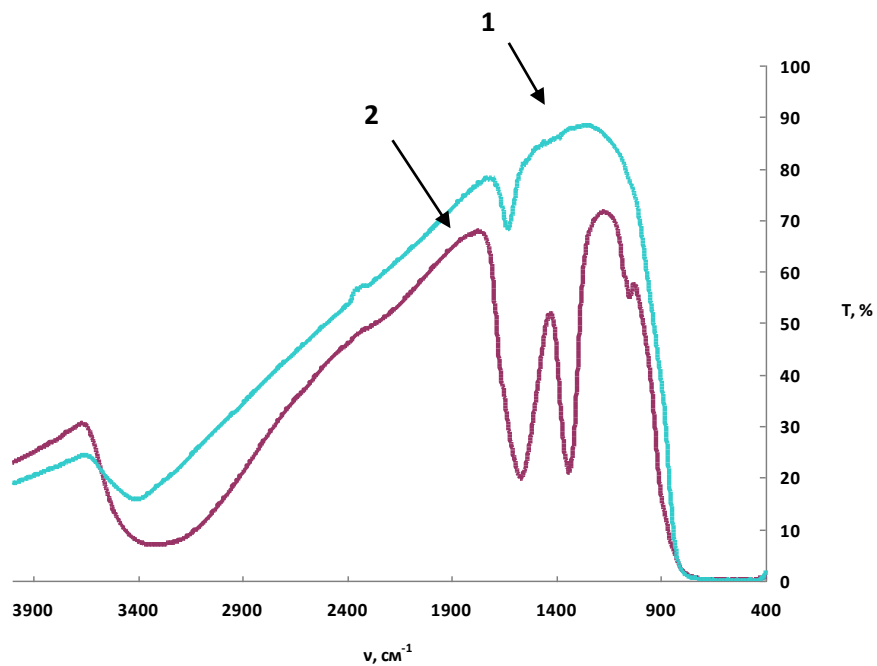


Рис. 33. ИК-спектры образцов TiO_2 в таблетках KBr: 1 – немодифицированного, 2 – модифицированного золь-гель нанесением $\text{Ti}(\text{OBu})_4$. ИК-спектр импринтированного сорбента не приведен, т.к. он идентичен спектру неимпринтированного сорбента.

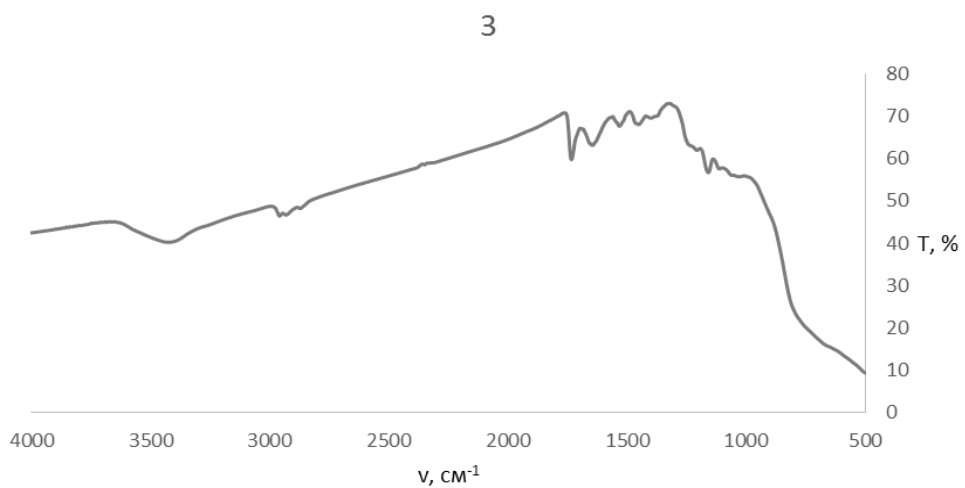
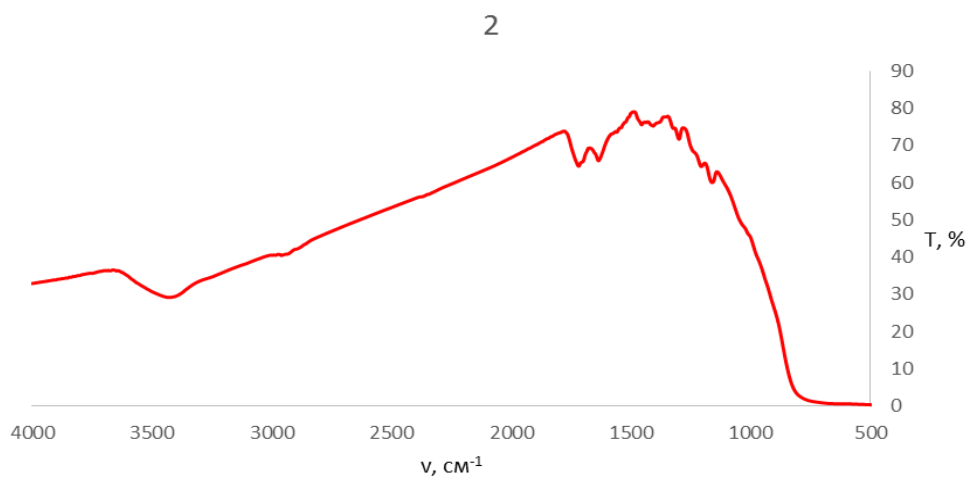
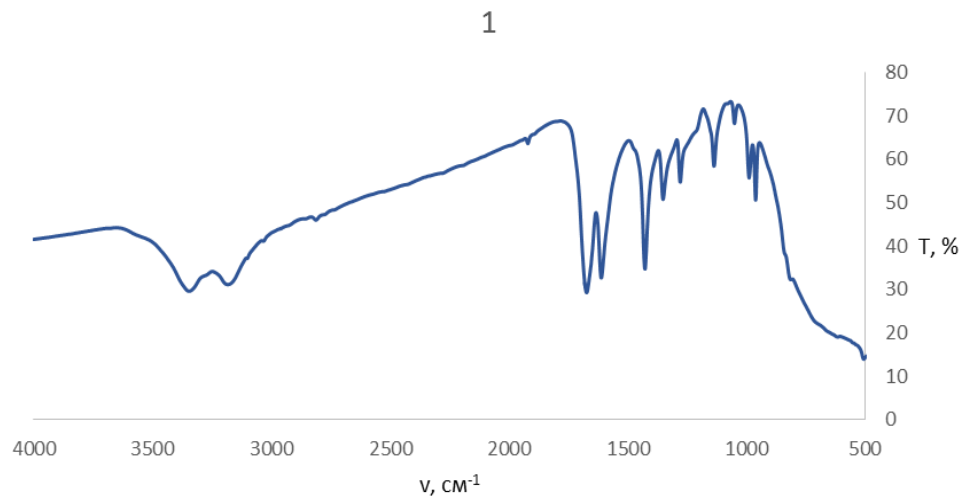


Рис. 34. ИК-спектры образцов TiO_2 в таблетках КВr: 1 - TiO_2 -ДЭДТК-АА, 2 - TiO_2 -МПС-АА, 3 - TiO_2 -АПТЭС-АА. (схемы 3, 4, 5).

Схема 5. Получение сорбента TiO_2 -ДЭДТК-АА: закрепление на поверхности модифицированного диоксида титана диэтилдитиокарбамината (ДЭДТК) с последующим поверхностным слоем полимеризованного акриламида (АА) [123]

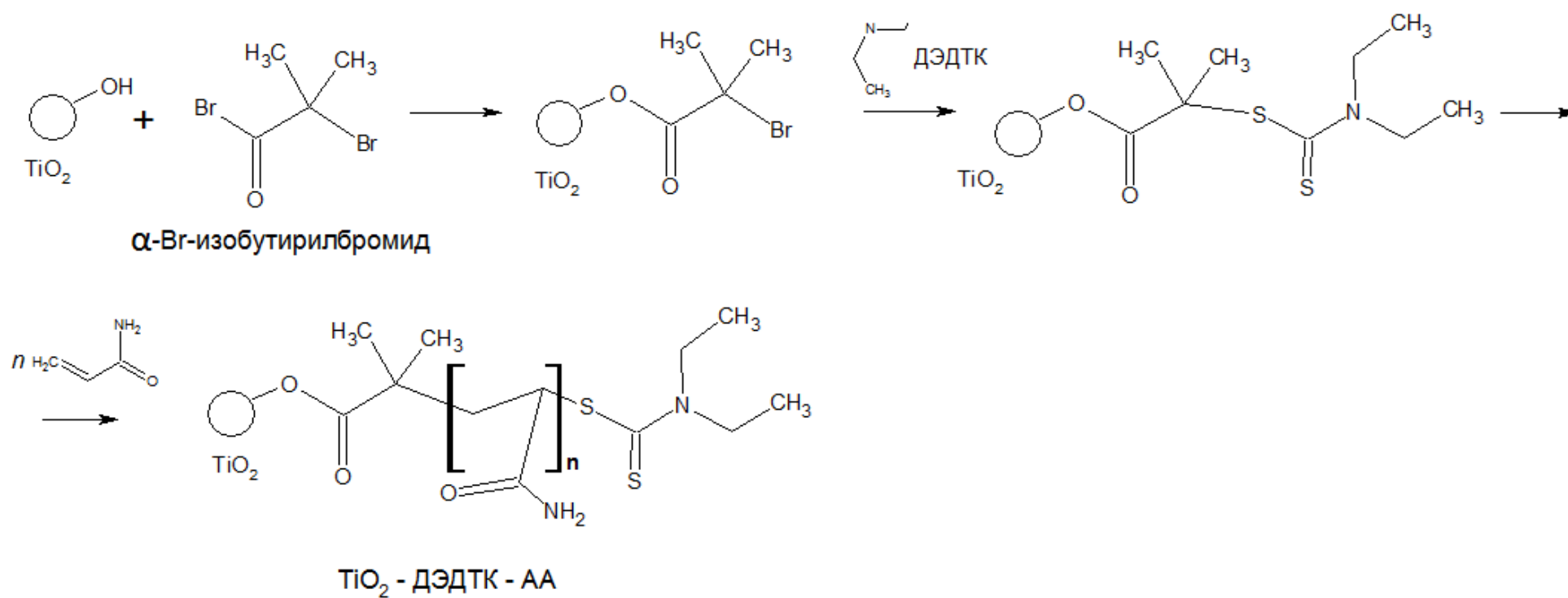


Схема 6. Получение сорбента TiO_2 -МПС-АА: закрепление на поверхности модифицированного диоксида титана (триметоксисилил)пропилметакрилата (МПС) с последующим поверхностным слоем полимеризованного акриламида (АА) [124, 125]

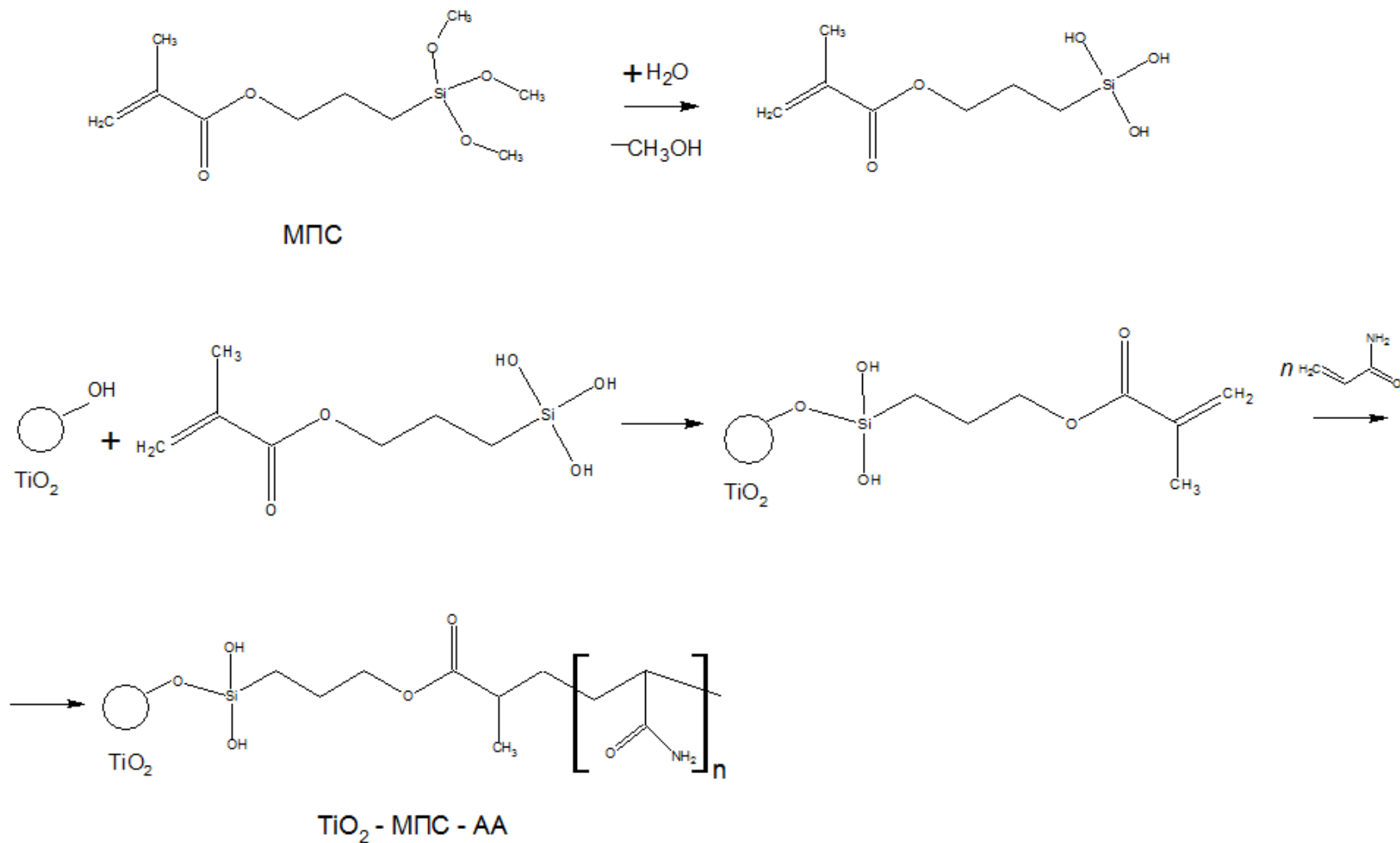
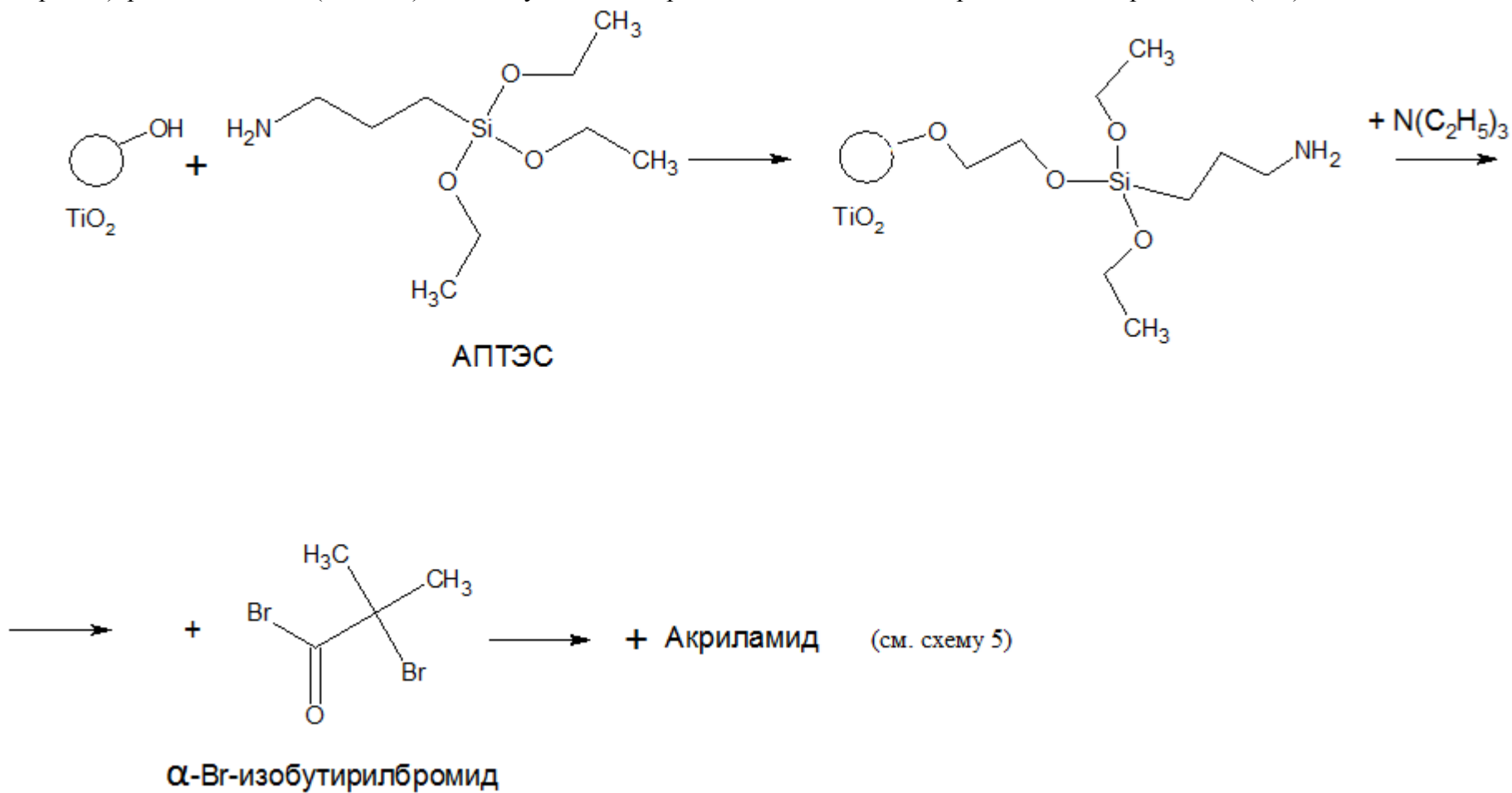


Схема 7. Получение сорбента TiO_2 -АПТЭС-АА: закрепление на поверхности модифицированного диоксида титана (3-аминопропил)триэтоксисилана (АПТЭС) с последующим поверхностным слоем полимеризованного акриламида (АА) [125, 126]



На микрофотографии (рис. 35) видно, что модифицирование TiO_2 практически не увеличивает размер частиц (средние диаметры частиц исходного и модифицированного TiO_2 составляют 23 ± 7 и 20 ± 8 нм, соответственно, ($n = 3$, $P = 0,95$) по 25 частицам), т.е. толщина импринтированной пленки геля невелика.

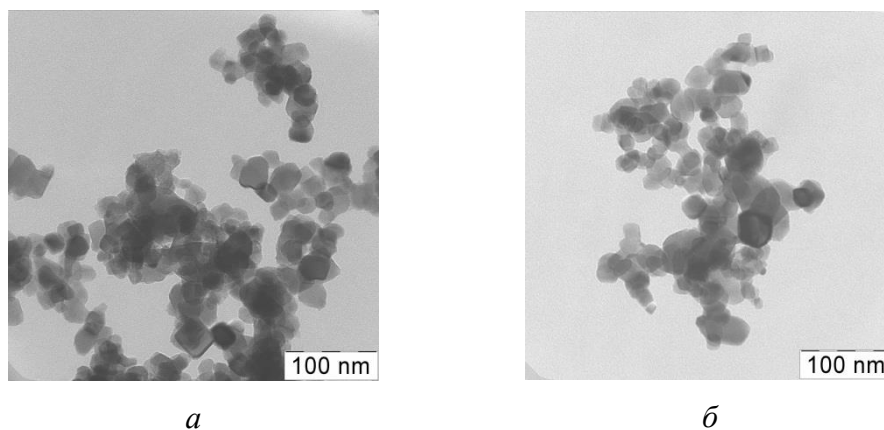


Рис. 35. Микрофотографии TiO_2 в просвечивающем электронном микроскопе: *а* – импринтированного экдистеном, *б* – немодифицированного TiO_2

в) Влияние условий получения импринтированных сорбентов

Качество получаемых сорбентов, импринтированных экдистеном, оценивали по количеству сорбированного экдистена (разность его содержания в растворе до и после сорбции, нормируемая на точную массу навески) и по величине импринтинг-факторов (ИФ), которые определяли, как отношение сорбированного количества экдистена импринтированным и неимпринтированным сорбентами в одних и тех же условиях.

Для изучения повторного связывания темплата навеску (около 10 мг) отмытого и высушенного сорбента помещали в стеклянную виалу ёмкостью 1.8 мл, добавляли 0.5 мл $1\cdot 10^{-5}$ М раствора экдистена в этаноле, перемешивали 30 мин, центрифугировали при 2000 об/мин, надосадочный слой отбирали дозатором, переносили в виалу и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Существенный фактор, влияющий на величины ИФ, – *концентрация буюксида титана* в реакционной смеси. Импринтинг экдистена (ИФ > 1) наблюдается в относительно узком диапазоне концентраций буюксида титана; при

импринтинге самого экдистена использовали 315 мкл буюксида, а экдистена в присутствии АФБК – 270 мкл (табл. 18).

Таблица 18. Зависимость импринтинг-фактора полученных сорбентов (ИФ) от количества вводимого буюксида титана(IV) (50 мг исходного TiO_2 , 5 мг темплата, содержание воды в толуоле 0.03%, без прививки поверхностных групп) ($n = 4, P = 0.95$)

Объем $Ti(OBu)_4$, мл	Темплат: экдистен	Темплат: экдистен – 3-аминофенилборная кислота
0.230	0.8	–
0.270	3.0 ± 1.9	2.2 ± 0.4
0.315	3.8 ± 0.3	1.2
0.360	0.2	–

Для получения отпечатков необходима определенная *концентрация темплата*, вводимого при импринтинге: для сорбентов, полученных в присутствии 1, 2.5 и 5.0 мг экдистена импринтинг-факторы равны 0.3, 0.8 и 3.8, соответственно. В дальнейшей работе использовали 5 мг темплата, поскольку увеличение количества темплата затрудняло его удаление.

Еще один фактор, влияющий на качество получаемых отпечатков фитостероидов, – *содержание воды* в реакционной смеси при импринтинге, поскольку от нее зависит скорость гидролиза алкоксида титана и формирования геля, в котором и образуются отпечатки темплата. Обнаружено, что как в отсутствие воды, так и при ее избытке (количество воды выше ее растворимости в толуоле) качество молекулярных отпечатков снижается (импринтинг-факторы уменьшаются, табл. 19). Далее для гидролиза алкоксида титана использовали 0.03% (об.) раствор воды в толуоле, что соответствует почти насыщенному раствору.

Сорбенты сохраняют свои свойства при хранении (ИФ, измеренные через 5 дней и 2 месяца после синтеза сорбента, различались не более чем на 6%), что подтверждает стабильность молекулярных отпечатков, полученных в матрице оксида титана(IV).

Таблица 19. Влияние количества воды при синтезе сорбентов на значения импринтинг-факторов при статической сорбции экдистена из его этанольного раствора (содержание буюксида титана (IV) 0.315 мкл и 0.270 мкл, соответственно, для экдистена и его комплекса с АФБК в качестве темплатов, без прививки поверхностных групп) (n = 3, P = 0.95)

Содержание воды в толуоле, % об.	Темплат	
	Экдистен	Экдистен – 3-аминофенилборная кислота
0	1.0	1.5
0.030	3.8 ± 0.3	2.2 ± 0.3
0.045	1.2	1.4

г) Прививка дополнительных поверхностных групп

Для прививки поверхностных групп использовали несколько методик (табл. 20, схемы 5, 6, 7), включающих закрепление на поверхности модифицированного диоксида титана: 1 – диэтилдитиокарбамината (ДЭДТК), 2 – (триметоксисилил)-пропилметакрилата (МПС), 3 – (3-аминопропил)триэтоксисилана (АПТЭС), причем завершающим этапом в каждой из методик была полимеризация слоя мономера – акриламида (АА), метакриловой кислоты (МАК) или 4-винилпиридина (ВП).

Таблица 20. Зависимость импринтинг-фактора при статической сорбции экдистена из его этанольного раствора от вида поверхностной модификации частиц диоксида титана(IV)

Сорбент		Процент сорбции экдистена на 1 мг сорбента		ИФ
		импринтированного	контрольного	
Без модификации	TiO ₂	11	3	3.8
Поверхностная модификация	TiO ₂ -ДЭДТК-АА	4	2	1.7
	TiO ₂ -ДЭДТК-МАК	6	10	0.6
	TiO ₂ -ДЭДТК-ВП	6	9	0.8
	TiO ₂ -МПС-АА	4	4	1.0
	TiO ₂ -АПТЭС-АА	5	6	0.9

Максимальный импринтинг-фактор и, следовательно, наилучшее качество молекулярных отпечатков удалось получить при поверхностной полимеризации акриламида на частицах TiO_2 , на поверхности которых предварительно закреплен диэтилдитиокарбаминат. Этот результат согласуется с данными ИК-спектроскопии (рис. 20), согласно которым интенсивность линий в спектре (а значит, и эффективность дополнительной модификации) TiO_2 -ДЭДТК-АА была значительно выше, чем в спектрах сорбентов, полученных по другим методикам.

Улучшить полученный результат, по нашим предположениям, можно было бы варьированием условий, влияющих на толщину и плотность прививаемого полимерного слоя, т.е. количества мономера и времени полимеризации (табл. 21 и 22).

Таблица 21. Зависимость импринтинг-фактора от количества мономера, используемого при прививке на TiO_2 полимерного слоя (АА – акриламид, МАК – метакриловая кислота)

Количество мономера, ммоль на 0.5 г TiO_2	Мономер	
	АА	МАК
12	1.7	0.6
1.2	1	0.7
0.12	1.4	1
0.012	1.2	0.8

Таблица 22. Зависимость импринтинг-фактора от времени полимеризации акриламида (сорбент TiO_2 -ДЭДТК-АА)

Время полимеризации, ч	ИФ
48	1.1
24	1.7
12	1.5
5	0.9

Однако, как видно из представленных данных, дополнительная поверхностная модификация импринтированных частиц диоксида титана(IV) слоем полимера ухудшает качество получаемых отпечатков (табл. 18–20). Возможно, это

происходит из-за пространственных затруднений при удалении темплата из-под слоя полимера или вследствие замедленной диффузии аналита при его повторном связывании. Таким образом, наилучшими по своим сорбционным свойствам и величине импринтинг-фактора оказались частицы TiO_2 с импринтированным слоем TiO_2 , нанесенным золь-гель методом, без привитого слоя полимера. Они и были использованы на дальнейшем этапе работы – получении картриджей для твердофазной экстракции фитостероидов.

III.3. Твердофазная экстракция и определение фитостероидов с помощью импринтированных сорбентов на основе TiO_2

III.3.1. Выбор условий сорбции и десорбции фитостероидов

Условия групповой сорбции фитостероидов выбирали на примере экдистена. Для изучения свойств импринтированных экдистеном сорбентов их помещали в картриджи для твердофазной экстракции (рис. 34) и пропускали через них раствор экдистена в этаноле.

За основу были взяты коммерчески доступные картриджи HyperSep C8 (100 мг, 1 мл, рис. 36а) фирмы Thermo, из которых удаляли сорбент и использовали корпус картриджа и две септы, удерживающие сорбент. В пустой картридж помещали септу, затем навеску (50 мг) полученного нами сорбента и вторую септу. Растворы прокачивали через картриджи с помощью манифолда Agilent для ТФЭ (Vacuum manifold processing station, рис. 36в) и вакуумного насоса Millipore (Vacuum pump XF54 230 50). Прежде чем проводить сорбцию, полученные картриджи кондиционировали (1 мл деионизованной воды, затем 1 мл 96% этанола), далее пропускали 0.5 мл пробы, промывали картридж 1 мл деионизованной воды и десорбировали экдистен с помощью 2 мл элюента. Элюат переносили в вials ёмкостью 1.8 мл и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

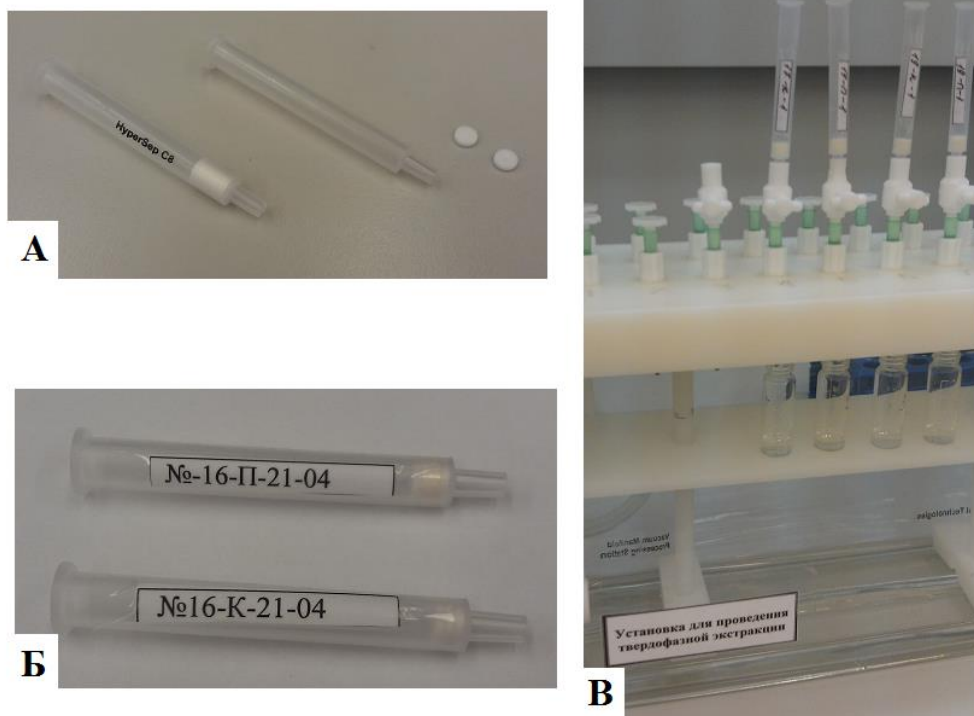


Рис. 36. Картриджи для твердофазной экстракции фитостероидов: А – коммерческий картридж Thermo и его пустой корпус, Б– корпуса картриджей Thermo, заполненные импринтированным и контрольным сорбентами, В – манифолд для твердофазной экстракции Agilent.

Таблица 23. Элюирующая сила растворителей, используемых в качестве элюента для десорбции экдистена с картриджей с импринтированным сорбентом

Растворитель	Элюирующая сила E^0	
	На окиси алюминия	На силикагеле
Хлористый метилен	0.42	0.32
Этилацетат	0.58	0.38
Ацетонитрил	0.65	0.50
Ацетон	0.56	-
Изопропанол	0.82	-

Элюенты, используемые при работе с картриджами, выбирали из рассмотренного ряда растворителей и их смесей (табл. 24). Степени извлечения этими растворителями экдистена согласуются с увеличением элюирующей силы в их ряду (см. табл. 23).

В случае сорбента с отпечатками экидистена с АФБК десорбцию проводили 1%-ным раствором муравьиной кислоты в смеси ацетон – ацетонитрил – изопропанол (10 / 45 / 45). Такую смесь растворителей применяют для десорбции сильно удерживаемых соединений с колонок для ВЭЖХ. (Муравьиную или уксусную кислоту используют в смеси с ацетонитрилом в качестве подвижной фазы при ВЭЖХ фитостероидов [94, 100].) В случае же картриджей с отпечатками комплекса экидистена без АФБК десорбция анализов проходит полнее без добавления муравьиной кислоты к смеси растворителей.

Таблица 24. Выбор элюента для десорбции экидистена с картриджем с импринтированным сорбентом

Элюент	Степень извлечения экидистена, %	
	Темплат: экидистен	Темплат: экидистен – 3-аминофенилборная кислота
Хлористый метилен	0.2	-
Этилацетат	0	-
Ацетонитрил + 0.1% НСООН	31	3
Ацетон / ацетонитрил / изопропанол (10 / 45 / 45)	74	79
Ацетон / ацетонитрил / изопропанол (10 / 45 / 45) + 1% НСООН	37	85

Таблица 25. Степень извлечения экидистена после его сорбции из этанольного раствора на картриджах для ТФЭ, заполненных МИП-сорбентами

Концентрация экидистена в исходном растворе, мкг/мл	Темплат: экидистен		Темплат: экидистен – 3-аминофенилборная кислота	
	Степень извлечения, %	ИФ*	Степень извлечения, %	ИФ*
1	65	2.3	79	2.8
5	74	2.6	85	3.1
10	76	2.7	92	3.3
25	74	2.7	88	3.1
50	80	2.9	87	3.1

* ИФ = степень извлечения (МИП) / степень извлечения (НИП), где степень извлечения НИП составила $(28 \pm 3)\%$ ($n = 3, P=0.95$).

Как видно из табл. 25, степень извлечения эхдистена импринтированными сорбентами (МИП) в 2.3 – 3.3 раза выше, чем неимпринтированным (НИП), что согласуется с образованием молекулярных отпечатков эхдистена на поверхности TiO_2 . При этом использование комплекса эхдистена с аминифенилборной кислотой в качестве темплата позволяет повысить степень извлечения на 7–22% по сравнению с использованием свободного эхдистена в качестве темплата. Из табл. 8 также можно видеть, что для относительно концентрированных растворов эхдистена (до 50 мкг/мл) степень извлечения не снижается.

III.3.2. Групповая сорбция фитостероидов сорбентами на основе TiO_2

а) Сорбция из экстракта серпухи венценосной

Фитостероиды извлекали из экстракта серпухи венценосной, содержащего их в большом количестве (см. разд. III.1.в). Для этого к навеске сухого экстракта (23 мг) добавляли 10 мл ДМСО, 10 мин перемешивали на орбитальном миксере и на 10 мин помещали в УЗ-ванну, затем центрифугировали при 2000 об/мин. Надосадочный слой отбирали дозатором и разбавляли в 10 раз 96% этанолом.

Этанольный раствор экстракта (0.5 мл, см. п. III.3.1) пропускали через картридж с исследуемым сорбентом. Десорбцию проводили так же, как и при индивидуальной сорбции эхдистена. Элюаты анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС (методика 1, Экспериментальная часть). Из рис. 37 видно, площади пиков на хроматограмме элюата для импринтированного сорбента (1) больше, чем для контрольного (2), а значит импринтированный сорбен извлекает фитостероиды в большей степени, чем неимпринтированный.

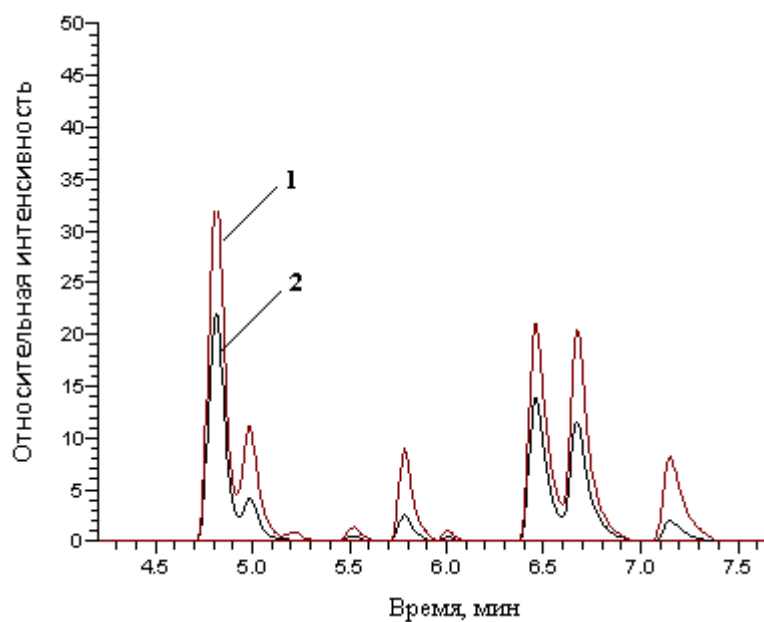


Рис. 37. Хроматограммы по полному ионному току элюатов экстракта серпухи венценосной после твердофазной экстракции на картриджах с импринтированным (1, темплат – экдистен) и неимпринтированным сорбентом (2): экдистен ($t_R = 4.8$ мин); туркестерон ($t_R = 5.0$ мин); макистерон А ($t_R = 5.3$ мин); экдизон ($t_R = 5.5$ мин); дакрихайнанстерон ($t_R = 5.8$ мин); макистерон С ($t_R = 6.0$ мин), компоненты матрицы (I-III): 6.5, 6.7, 7.2 мин

Предполагали, что из-за сходства структур все фитостероиды будут связываться отпечатками экдистена. Как видно из табл. 26, все обнаруженные в экстракте фитостероиды действительно извлекаются сорбентом, импринтированным экдистеном, причем даже в большей степени, чем сам экдистен. Существенно, что компоненты матрицы экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме, не сорбируются (табл. 26), что свидетельствует о селективности полученных сорбентов.

На сорбенте, полученном в присутствии 3-аминофенилборной кислоты, степени извлечения фитостероидов выше (70–85%), чем без нее. Однако возрастает и степень извлечения посторонних компонентов экстракта, особенно одного из них (компонент III в табл. 26). Таким образом, сорбенты, импринтированные экдистеном и комплексом экдистен – АФБК, по свойствам взаимно дополняют друг друга.

Таблица 26. Степени извлечения фитостероидов (%) из этанольного экстракта серпухи венценосной после твердофазной экстракции на картриджах с сорбентами, импринтированными экдистеном или его комплексом с 3-аминофенилборной кислотой (МИП), и неимпринтированными сорбентами (НИП), и величины импринтинг-факторов (ИФ) (n = 3, P = 0.95)

Аналит	Темплат					
	Экдистен			Экдистен – 3-аминофенилборная кислота		
	НИП	МИП	ИФ [#]	НИП	МИП	ИФ [#]
Экдистен	23±3**	41±4	1.8	7.3±0.5	80±4	11
Экдизон	39±3	73±2	1.9	0.9±0.3	78±3	83
Туркестерон	37±2	68±7	1.9	1.1±0.3	70±3	62
Дакрихайнанстерон	33±2	93±3	2.8	1.6±0.3	75±3	48
Макистерон А	15±3	46±4	3.0	0.13±0.06	76±3	— ^{##}
Макистерон С	58±3	111±8	1.9	0.3±0.1	85±3	— ^{##}
Компонент матрицы I*	0.07±0.01	0.24±0.06	3.4	0.12±0.04	0.34±0.08	2.8
Компонент матрицы II*	0.10±0.01	0.14±0.03	1.4	0.16±0.03	0.46±0.09	2.9
Компонент матрицы III*	2.2±0.2	6.7±0.5	3.0	2.80±0.25	64±5	23

* Компоненты экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме (не идентифицированы)

** Доверительные интервалы рассчитаны из трех параллельных измерений

Импринтинг-фактор, рассчитанный как отношение степеней извлечения компонента импринтированным и неимпринтированным TiO₂

Эти значения имеют высокую погрешность из-за низкой сорбции макистеронов на неимпринтированном TiO₂

Из табл. 25 и 26 видно, что картриджи с НИП извлекают фитостероиды из растительного экстракта значительно слабее, чем из чистого раствора экдистена. Вероятно, это вызвано подавлением сорбции фитостероидов компонентами растительного экстракта. На МИП-сорбентах сорбция экдистена также снижается – с 65–80% (чистые растворы экдистена, табл. 25) до 40% (растительный экстракт, табл. 26), но лишь в том случае, когда в качестве темплата использовали экдистен; если же импринтировали комплекс экдистена с АФБК, извлечение сохраняется на уровне 80–90%, что и вызывает наблюдаемое повышение ИФ при переходе от

чистого раствора экдистена к растительному экстракту и от эдистена к его комплексу в качестве темплата.

Селективность сорбентов оценивали следующим образом: рассчитали коэффициент селективности (табл. 27) как отношение усредненной степени извлечения фитостероидов к степени извлечения компонентов экстракта (I, II и III).

Таблица 27. Коэффициенты селективности импринтированных сорбентов и силикагеля С-18 по отношению к компонентам экстракта

Компонент экстракта	Темплат		Силикагель С-18
	Экдистен	Экдистен – 3-АФБК	
I	$3.0 \cdot 10^2$	$2.2 \cdot 10^2$	1.4
II	$5.1 \cdot 10^2$	$1.7 \cdot 10^2$	1.2
III	11	1.2	1.0

Как видно из табл. 27, сорбенты, импринтированные как эдистеном, так и его комплексом с производным борной кислоты, обеспечивают высокие факторы разделения фитостероидов и посторонних компонентов экстракта I и II (порядка сотен), тогда как гидрофобизованный силикагель фактически не позволяет проводить такое разделение. Что касается еще одного компонента экстракта (вещество III), отделение от него наиболее эффективно при использовании сорбента, импринтированного эдистеном (фактор разделения около 10).

К достоинствам разработанной методики концентрирования относятся возможность одновременного выделения и группового концентрирования фитостероидов из растительного экстракта при одновременном отделении примесей. Описанные в литературе [96, 103, 104, 106, 111] подходы являются многостадийными с последовательным отделением сначала примесей, а затем выделением отдельных фитостероидов в зависимости от их полярности. Если перед анализом не отделяют мешающие компоненты, то в дальнейшем используют, например, радиоиммунные методы, позволяющие оценить примерное суммарное содержание целевых аналитов.

Использование нашего подхода к концентрированию целевых аналитов позволяет экспрессно проводить пробоподготовку растительных экстрактов, отделяя при этом мешающие компоненты, и, следовательно, повышая чувствительность и селективность последующего определения.

б) Сорбция из фармпрепаратов на основе левзеи

С использованием картриджей с импринтированным сорбентом на основе TiO_2 выделяли и концентрировали фитостероиды из аптечных препаратов на основе левзеи (*Rhaponticum carthamoides*): биологически активная добавка в таблетках «Левзея» и спиртовая настойка «Экстракт левзеи».

Для изучения сорбции фитостероидов из аптечного экстракта левзеи дозатором отбирали 1 мл препарата и добавляли 3 мл 96% этанола.

Для изучения сорбции фитостероидов из таблеток «Левзея» 1 таблетку помещали в виалу на 15 мл, добавляли 1 мл 0.1М HCl и помещали на 10 мин в УЗ-ванну. Далее к содержимому виалы добавляли 9 мл 96% этилового спирта и снова помещали в УЗ-ванну на 10 мин, затем центрифугировали при 2000 об/мин.

Полученные образцы пропускали через картридж с исследуемым сорбентом см. п. III.3.1), элюаты анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС (методика 1, Экспериментальная часть).

Отметим, что производителями заявлено только содержание экстракта или растительного сырья в каждом препарате, но нет сведений о количестве фитостероидов или других активных компонентов. Дальнейшее определение фитостероидов в элюате проводили методом ВЭЖХ-МС/МС по методике 1.

Препараты на основе левзеи содержали два фитостероида: экдистен и аюгастерон С. Импринтированный сорбент позволяет извлекать из «Экстракта левзеи» более 80% экдистена и более 70% аюгастерона С, что от 3 до 10 раз больше, чем сорбентом без молекулярных отпечатков (рис. 38, табл. 28).

Различие в сорбции импринтированным образцом фитостероидов из таблеток и экстракта мы связываем с наличием в таблетках вспомогательных веществ (лактоза, метилцеллюлоза, стеарат кальция, тальк, твин 80, диоксид титана, краситель E122). Сорбция аюгастерона из таблеток могла быть ниже и

вследствие недостаточного разбавления образцов, если превышалась емкость сорбента.

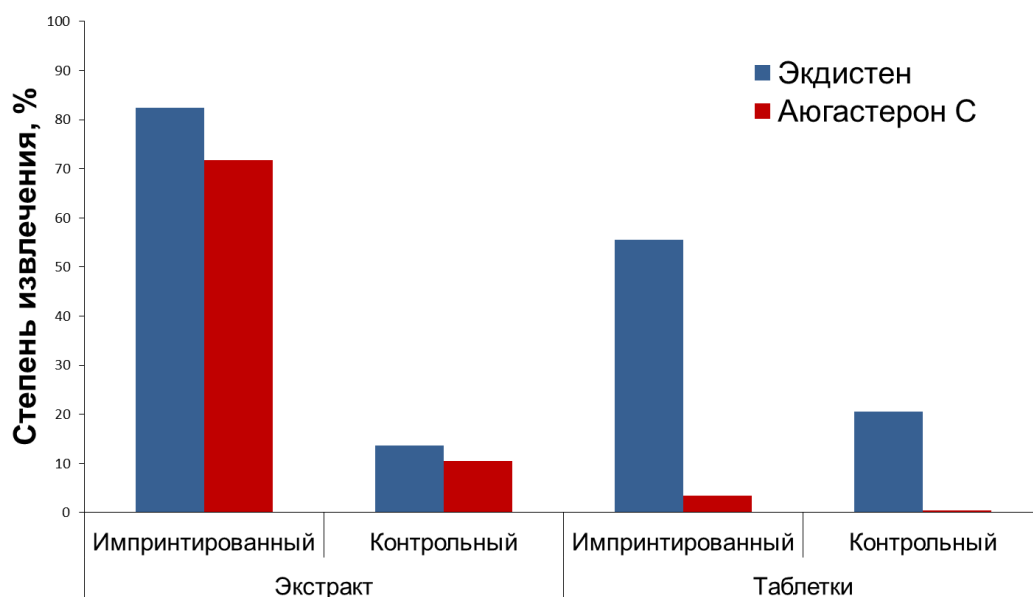


Рис. 38. Степени извлечения фитостероидов из препаратов на основе левзеи (*Rhaponticum carthamoides*) после твердофазной экстракции на картриджах с сорбентами на основе TiO_2 (импринтированными и неимпринтированными).

Таблица 28. Импринтинг-факторы сорбентов при твердофазной экстракции фитостероидов из препаратов на основе левзеи (*Rhaponticum carthamoides*)

Препарат	Экдистен	Аюгастерон С
Таблетки «Левзея»	2.7	9.8
Экстракт левзеи	6.0	6.8

III.3.3. Сорбция фитостероидов на гидрофобизированном силикагеле

Для оценки селективности импринтированных сорбентов и эффективности концентрирования целевых аналитов провели сорбцию на коммерчески доступных картриджах Zorbax C18 с гидрофобизированным силикагелем (методика 16, Экспериментальная часть).

а) Экстракт серпухи венценосной

На этом сорбенте минорные фитостероиды (табл. 29) удерживаются, но сам экдистен (основной фитостероид) сорбируется слабо (примерно в той же степени,

как на неимпринтированном TiO₂). Кроме того, гидрофобизованный силикагель значительно (более чем на 50%) извлекает компоненты матрицы экстракта. Эти данные подтверждают преимущества сорбентов на основе TiO₂.

Таблица 29. Степени извлечения (%) фитостероидов из этанольного экстракта серпухи венценосной после твердофазной экстракции (картриджи с силикагелем, имеющим привитые группы C18) (n = 3, P = 0.95)

Аналит	Степень извлечения, %
Экдистен	28 ± 3
Экдизон	84 ± 8
Туркестерон	75 ± 6
Дакрихайнанстерон	85 ± 10
Макистерон А	109 ± 8
Макистерон С	108 ± 11
Компонент матрицы 1*	57 ± 8
Компонент матрицы 2*	66 ± 9
Компонент матрицы 3*	78 ± 7

* Компоненты экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме

б) Фармпрепараты на основе левзеи

На хроматограммах по полному ионному току (ВЭЖХ-МС/МС) анализируемых препаратов присутствовали пики сопутствующих компонентов. Результаты показали (рис. 39, 40), что сорбенты с гидрофобизованным силикагелем сорбируют фитостероиды менее эффективно (до 60% из экстракта и до 10% из таблеток), чем импринтированные сорбенты. При этом меньше и селективность извлечения целевых аналитов (рис. 39): часть сопутствующих компонентов также извлекается гидрофобизованным силикагелем (пики с временами удерживания 4.5, 4.8, 5.8 и 6.2 мин).

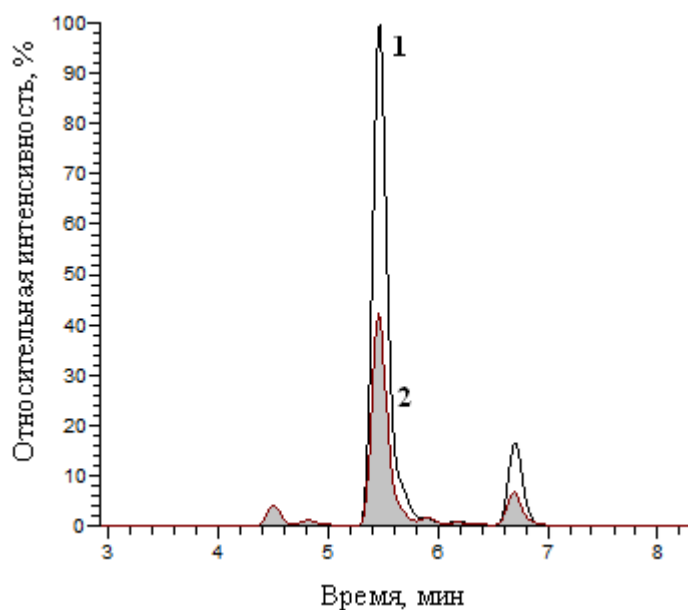


Рис. 39. Хроматограммы элюатов «Экстракта левзеи» после твердофазной экстракции фитостероидов (экдистен – $t_R = 5.5$ мин, аюгастерон – $t_R = 6.7$ мин): 1 – на картриджах с импринтированным сорбентом, 2 – на картриджах с гидрофобизованным силикагелем.

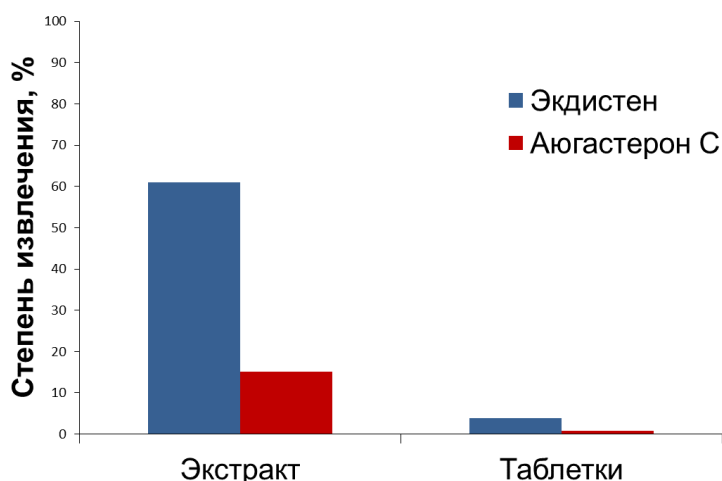


Рис. 40. Степени извлечения фитостероидов из препаратов на основе левзеи (*Rhaponticum carthamoides*) после твердофазной экстракции на картриджах с гидрофобизованным силикагелем.

Ш.3.4. Применение импринтированных сорбентов при анализе растительных экстрактов методом ВЭЖХ-МС низкого разрешения

Полученные картриджи опробованы для анализа растительных экстрактов серпухи и левзеи методами ВЭЖХ-МС (рис. 41–44) низкого разрешения и ВЭЖХ-УФ (рис. 45–46). Видно, что картриджи с импринтированным сорбентом позволяют отделить многие компоненты матрицы, причем более эффективно, чем силикагель-С-18. Хроматограмма экстракта серпухи после сорбции на силикагеле

С-18 (рис. 41, кривая 2) содержит интенсивные пики как фитостероидов (время удерживания 5.5 – 7 мин), так и компонентов экстракта (время удерживания 4.6 и 7.1 – 8.5 мин), т.к. сорбент не позволяет эффективно отделять их.

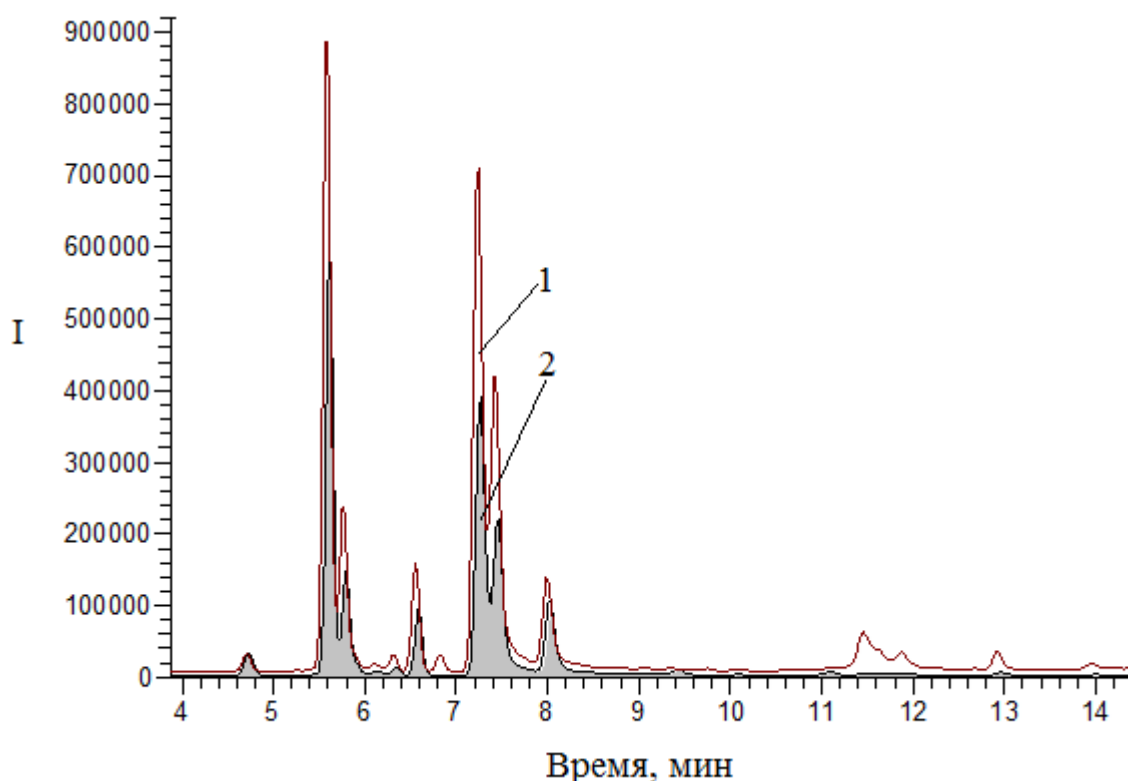


Рис 41. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС низкого разрешения) экстракта серпухи: 1 – исходный образец, 2– после сорбции на силикагеле С-18 (экдистен – 5.6 мин, фитостероиды – 5.2 – 6.8 мин).

После сорбции на импринтованном сорбенте (рис. 42, кривая 1) на хроматограмме отчетливо видны пики фитостероидов (они значительно менее интенсивные, чем на кремнеземе С-18 вследствие меньшей концентрации исходного образца). Отметим, что импринтированный сорбент не обладает абсолютной селективностью, и отдельные примеси в элюате также присутствуют (времена удерживания 9.5, 11.5 мин). Аналогичную картину можно видеть и для препаратов левзеи, проанализированных с использованием силикагеля С-18 (рис. 43) и импринтированного сорбента (рис. 44).

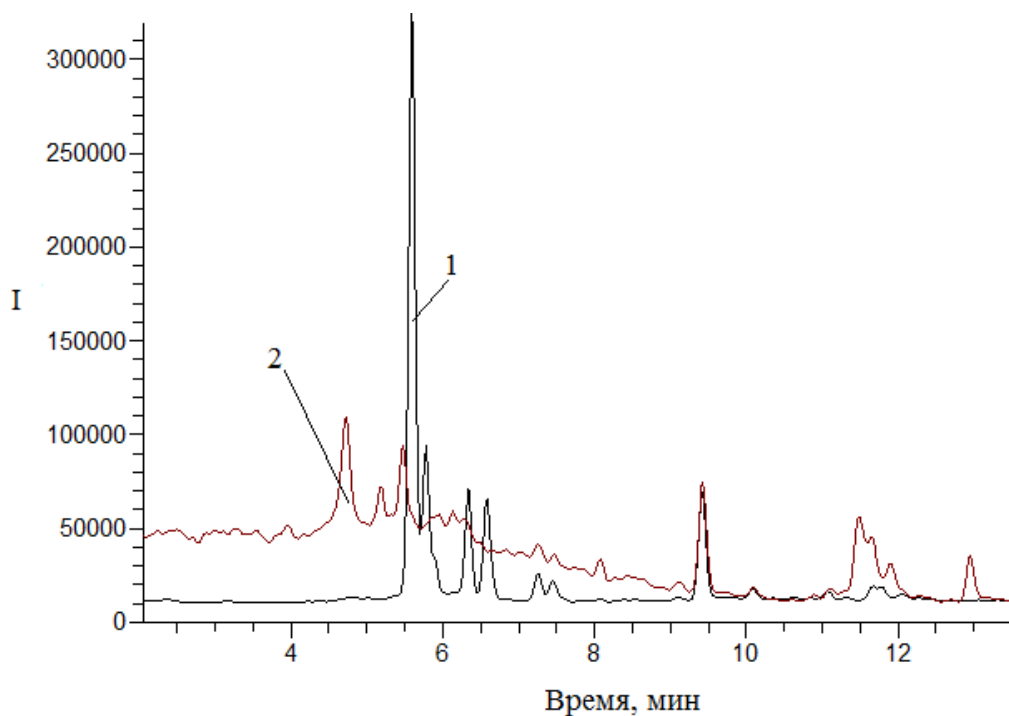


Рис. 42. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС низкого разрешения) экстракта серпухи: 1 – после сорбции на импринтированном TiO_2 , 2 – после сорбции на контрольном TiO_2 (экдистен – 5.6 мин, фитостероиды – 5.2 – 6.8 мин).

Как показано в разделе III.1.е, ВЭЖХ-МС низкого разрешения позволяет прямо определять фитостероиды в растительном экстракте в режиме тандемной масс-спектрометрии. Тем не менее, импринтированные сорбенты могут найти применение при невозможности хроматографического отделения фитостероида от компонента какого-то другого растительного экстракта. Кроме того, концентрирование фитостероидов на импринтированном сорбенте позволит сделать анализ более экспрессным, т.к. не потребуется полное разделение всех соединений, если основную их часть можно будет отделить на стадии сорбции.

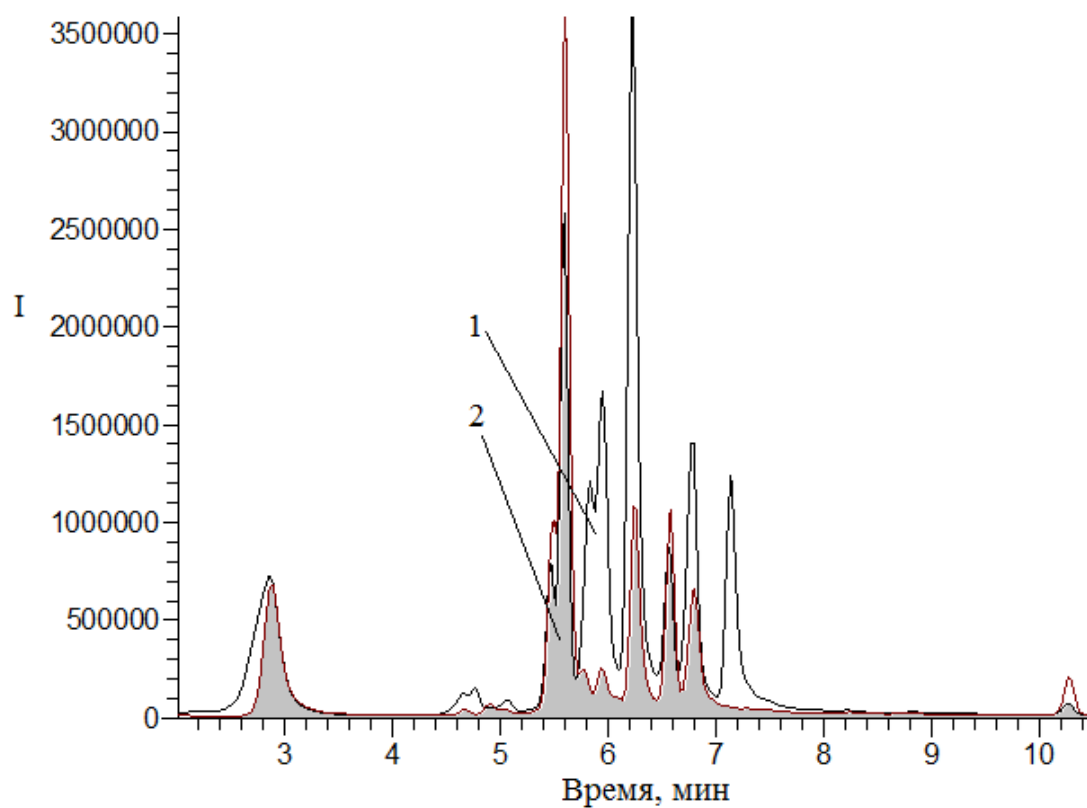


Рис. 43. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС низкого разрешения) экстракта левзеи: 1 – исходный образец, 2– после сорбции на силикагеле-С-18 (экдистен – 5.6 мин, аюгастерон С – 6.8 мин).

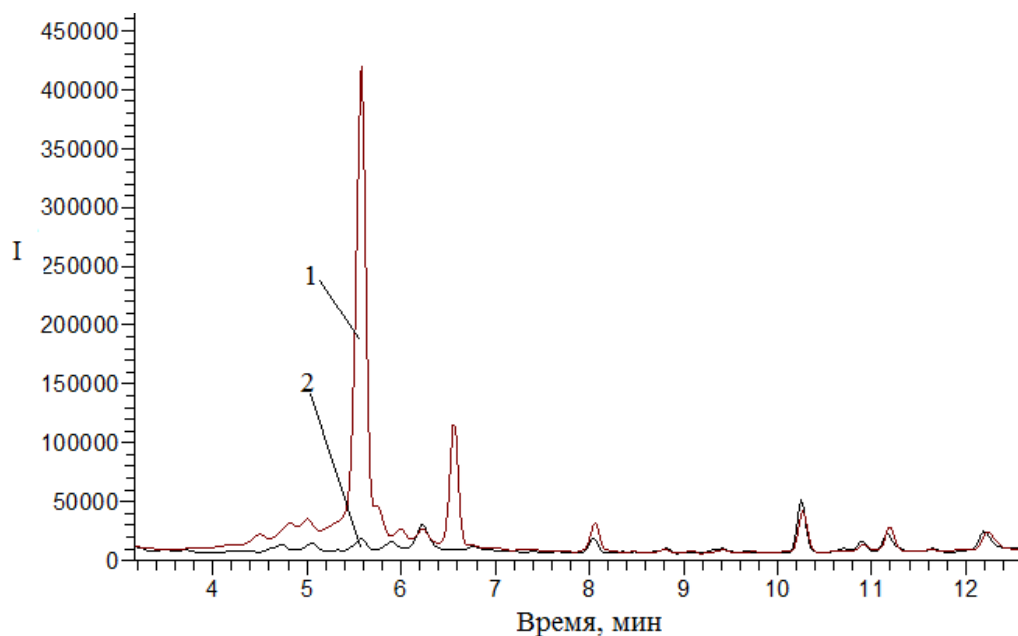


Рис. 44. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС низкого разрешения) экстракта левзеи: 1 – после сорбции на импринтированном TiO_2 , 2– после сорбции на контрольном TiO_2 (экдистен – 5.6 мин, аюгастерон С – 6.8 мин).

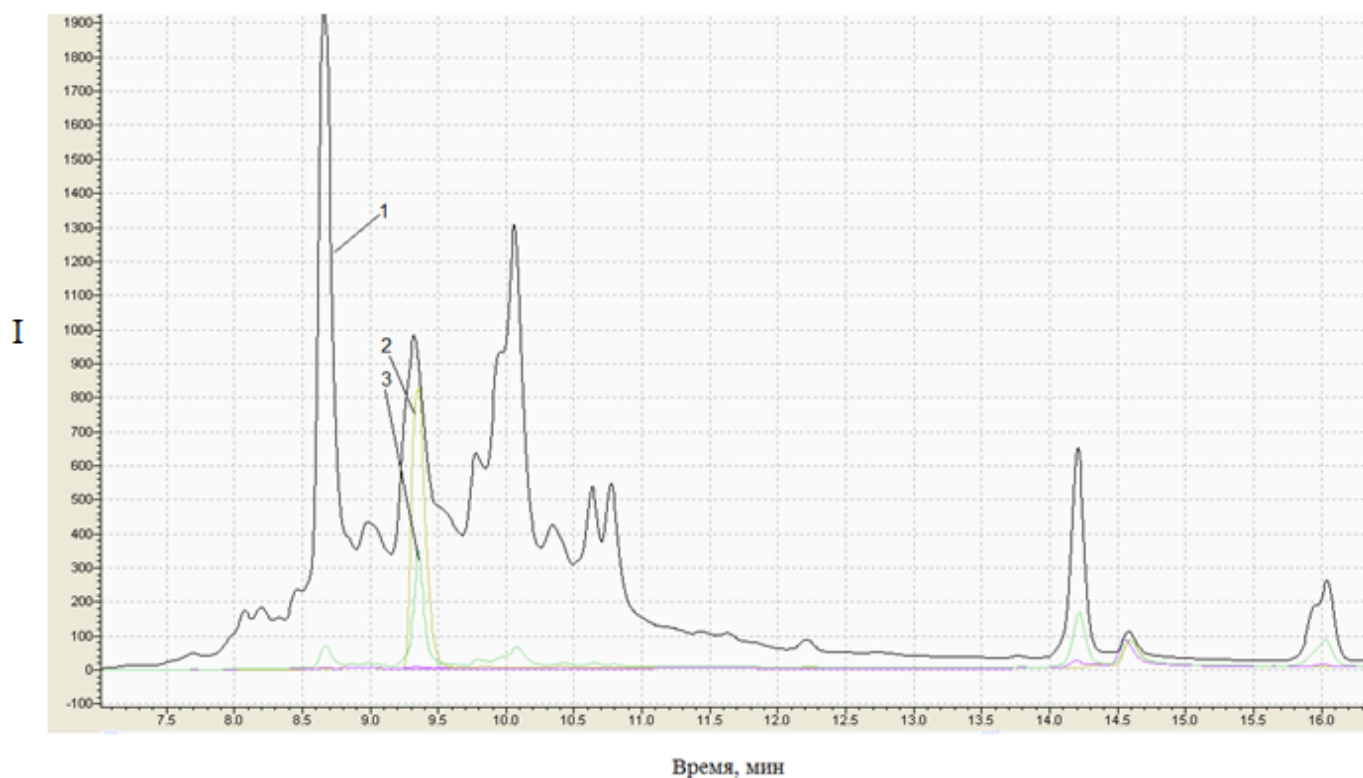


Рис. 45. Хроматограмма (ВЭЖХ-УФ) экстракта серпухи: 1 – исходный образец, 2 – после сорбции на импринтированном TiO_2 , 3 – после сорбции на силикагеле-С-18 (экдистен – 9.4 мин).

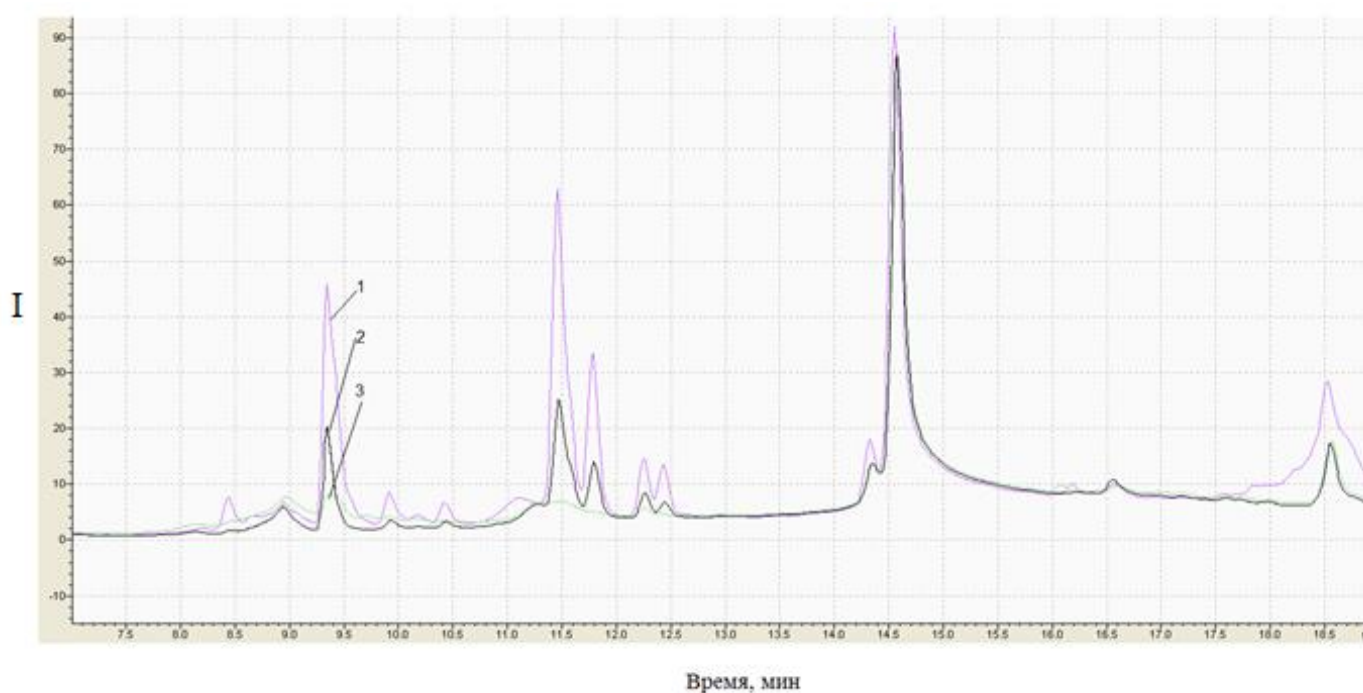


Рис. 46. Хроматограмма (ВЭЖХ-УФ) экстракта левзеи: 1 – исходный образец, 2 – после сорбции на импринтированном TiO_2 , 3 – после сорбции на силикагеле-С-18 (экдистен – 9.4 мин).

Хроматограмма исходного фармпрепарата левзеи содержит много неразделенных пиков (6.5–11 мин), анализ тех же элюатов методом ВЭЖХ-УФ показал, что сорбент с молекулярными отпечатками эффективнее отделяет компоненты матрицы (рис. 45, кривая 2, рис. 46, кривая 2), чем силикагель С-18 (рис. 45, кривая 3, рис. 46, кривая 3). Таким образом, картриджи с импринтированным сорбентом позволяют эффективно отделять ряд компонентов растительного экстракта.

* * *

В результате проведенного исследования удалось получить сорбенты с молекулярными отпечатками экидистена и его комплекса с 3-аминофенилборной кислотой для групповой сорбции фитостероидов из растительных экстрактов и препаратов. Картриджи для твердофазной экстракции на основе импринтированных сорбентов позволяют экспрессно концентрировать целевые аналиты и их селективно выделять. Также показано их преимущество перед коммерчески доступными картриджами с гидрофобизированным силикагелем С18.

Существующие методы выделения и концентрирования компонентов растительных экстрактов в основном относятся к сорбционным и хроматографическим, состоят из большого числа стадий и весьма длительны. Такой подход не всегда целесообразно использовать, если нет задачи выделения каждого фитостероида отдельно. Разработанный нами подход позволяет экспрессно концентрировать и селективно выделять группу целевых аналитов на сорбентах в форме картриджей для твердофазной экстракции. Использование сорбентов с молекулярными отпечатками позволяет уменьшить число необходимых стадий выделения целевых аналитов (например, по сравнению со схемой 1 [96]). Тем самым упрощается этап извлечения (снижаются трудозатраты и объем растворителей, сокращается время пробоподготовки) и потенциально уменьшаются потери, что особенно важно при определении минорных фитостероидов.

Разработанные сорбенты будут полезны и при идентификации и определении этих соединений методами, требующими снижения влияния компонентов матрицы растительного экстракта: радиоиммунным, ВЭЖХ-МС

низкого разрешения, ВЭЖХ с УФ-детектированием. Селективное выделение группы исследуемых соединений позволит улучшить метрологические характеристики определения перечисленными методами как основных, так и минорных фитостероидов.

Выводы

1. Выбраны условия экспрессной идентификации соединений класса фитостероидов, позволяющие идентифицировать их в сложных матрицах и смесях (таких как растительные экстракты и фармпрепараты) без предварительного препаративного разделения или использования большого числа стандартных образцов фитостероидов. Разработана методика идентификации и определения фитостероидов в матрице растительного экстракта методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения.

2. Определены характеристичные переходы для определяемых фитостероидов, описаны и подтверждены схемы их фрагментации. В анализируемых образцах растительных экстрактов и фармпрепаратов на основе серпухи венценосной и левзеи среди найденных неизвестных соединений идентифицированы фитостероиды и определено их содержание в расчете на экистен.

3. Получены молекулярные отпечатки фитостероидов. Для получения отпечатков использован слой TiO_2 , нанесенный на наночастицы TiO_2 путем гидролиза *n*-бутоксид титана. Показана возможность групповой сорбции фитостероидов сорбентом с отпечатками одного из представителей соединений этого класса – экистена. Степени извлечения фитостероидов импринтированным сорбентом в 2–3 раза выше, чем неимпринтированным. На примере экистена в качестве темплата показано, что стабильность молекулярного отпечатка в матрице TiO_2 выше, чем в полиэлектrolитном мультислойе и белке, что объяснено увеличением конформационной жесткости матрицы.

4. С использованием молекулярно-импринтированных сорбентов получены картриджи для твердофазной экстракции и разработана экспрессная методика селективного извлечения фитостероидов из растительного экстракта. Факторы разделения фитостероидов и посторонних компонентов растительного экстракта составляют $10^{1-n} \cdot 10^2$. Сорбент, импринтированный комплексом экистена с 3-аминофенилборной кислотой, более эффективен, чем импринтированный только экистеном (степень извлечения фитостероидов из растительного экстракта до 75–80%), однако менее селективен (степень извлечения

некоторых компонентов матрицы до 64%). Показана более высокая селективность импринтированных сорбентов по сравнению с гидрофобизованным силикагелем.

Список литературы

1. Гендриксон О.Д., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Молекулярно-импринтованные полимеры и их применение в биохимическом анализе. // Усп. биол. химии. 2006. Т. 46. С. 149–192.
2. Jiang X., Jiang N., Liu M. Small organic molecular imprinted materials: their preparation and application. // Anal. Bioanal. Chem. 2007. V. 389. No.2. P. 355–368.
3. Uzuna L., Turner A.P.F. Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential. // Biosens. Bioelectron. 2016. V. 76. P. 131–144.
4. Gauczinski J., Zan Liu, Zhang X.P., Schönhoff M. Mechanism of surface molecular imprinting in polyelectrolyte multilayers. // Langmuir. 2010. V. 26. No 12. P. 10122–10128.
5. Bruening M.L., Sullivan D.M. Enhancing the ion-transport selectivity of multilayer polyelectrolyte membranes. // Chem. Eur. J. 2002. V. 8. No. 17. P. 3832–3837.
6. Stair J.L., Harris J.J., Bruening M.L. Enhancement of the ion-transport selectivity of layered polyelectrolyte membranes through cross-linking and hybridization. // Chem. Mater. 2001. V. 13. No. 8. P. 2641–2648.
7. Guo Y., Geng W., Sun J. Layer-by-layer deposition of polyelectrolyte-polyelectrolyte complexes for multilayer film fabrication. // Langmuir. 2009. V. 25. No. 2. P. 1004–1010.
8. Liu Z., Yi Y., Gauczinski J., Xu H., Schönhoff M., Zhang X.P. Surface molecular imprinted layer-by-layer film attached to a porous membrane for selective filtration. // Langmuir. 2011. V. 27. No. 19. P. 11806–11812.
9. Gauczinsky J., Liu Z., Zhang X., Schonhoff M. Surface molecular imprinting in layer-by-layer films on silica particles. // Langmuir. 2012. V. 28. No. 9. P. 4267–4273.
10. Yu Q., Deng S., Yu G. Selective removal of perfluorooctane sulfonate from aqueous solution using chitosan-based molecularly imprinted polymer adsorbents. // Water Res. 2008. V. 42. No. 12. P. 3089–3097.
11. Ma X., Chen R., Zheng X., Youn H., Chen Z. Preparation of molecularly imprinted CS membrane for recognizing naringin in aqueous media. // Polym. Bull. 2011. V. 66. No. 6. P. 853–863.

12. Chen A., Zeng G., Chen G., Hu X., Yan M., Guan S., Shang Cui., Lu L., Zou Z., Xie G. Novel thiourea-modified magnetic ion-imprinted chitosan/TiO₂ composite for simultaneous removal of cadmium and 2,4-dichlorophenol. // Chem. Eng. J. 2012. V. 191. P. 85–94.
13. Jang S., Jensen A.T., Lutkenhaus J.L. Confinement effects on cross-linking within electrostatic layer-by-layer assemblies containing poly(allylamine hydrochloride) and poly(acrylic acid). // Macromol. 2010. V. 43. No. 22. P. 9473–9479.
14. Kempe H., Kempe M. Influence of salt ions on binding to molecularly imprinted polymers. // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 396. No. 4. P. 1599–1606.
15. Multilayer thin films. Sequential assembly of nanocomposite materials. Ed. G. Decher, J.B. Schlenoff. Wiley, 2002.
16. Lequieu W., Shtanko N.I., Du Prez F.E. Track etched membranes with thermo-adjustable porosity and separation properties by surface immobilization of poly(N-vinylcaprolactam). // J. Membr. Sci. 2005. V. 256. No. 1–2. P. 64–71.
17. Apel P. Yu., Blonskaya I. V., Dmitriev S. N., Mamonova T. I., Orelovitch O. L., Sartowska B., Yamauchi Yu. Surface-controlled etching of ion track nanopores and its practical application in membrane technology. // Radiat. Meas. 2008. V. 43. P. S552–S559.
18. Жданов Г.С., Китаева Н.К., Баннова Е.А., Миняйло Л.В. Основные подходы к модифицированию трековых мембран из полиэтилентерефталата. // Мембраны. 2004. № 2. С. 3–8.
19. Нечаев А.Н., Апель П.Ю., Черкасов А.Н., Полоцкий А.Е., Первов Н.В., Трофимов Д.А., Сергеев А.В., Мчедлишвили Б.В. Высокопроизводственные трековые ультрафильтрационные мембраны. // Мембраны. 2003. № 4. С. 18–22.
20. Bossi A., Bonini F., Turner A., Piletsky S. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of art. // Biosens. Bioelectron. 2007. V. 22. No. 6. P. 1131–1137.
21. Wulff G., Vesper W., Grobe-Einsler R., Sarhan A. Enzyme-analogue built polymers. // Makromol. Chem. 1977. V. 178. No. 10. P. 2799–2818.

22. Tamayo F., Martin-Esteban A. Selective high performance liquid chromatography imprinted-stationary phases for screening of phenylurea herbicides in vegetable samples. // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1098. No. 1–2. P. 116–122.
23. Kim T., Ki C., Cho H., Chang T., Chang J. Facile preparation of core-shell type molecularly imprinted particles: molecular imprinting into aromatic polyimide coated on silica spheres. // *Macromolecules*. 2005. V. 38. No. 15. P. 6423–6428.
24. Alexander C., Andersson H., Andersson L., Ansell R., Kirsch N., Nicholls I., O'Mahony J., Whitcombe M. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. // *J. Mol. Recognit.* 2006. V. 19. P. 106–180.
25. Поляков М. В. Адсорбционные свойства силикагеля и его структура. // *Журн. физ. химии*. 1931. Т. 2. Вып. 6. С. 799–805.
26. Curti R., Colombo U. Active sites in stereoselective adsorbents as models of drug receptors and enzyme active sites. // *Chim. Ind.* 1951. V. 23. P. 103.
27. Curti R., Colombo U. Chromatography of stereoisomers with «tailor made» compounds. // *J. Am. Chem. Soc.* 1952. V. 74. No. 15. P. 3961–3961.
28. Klabunovskii E., Agronomov A., Volkov L., Balandin A. Absorption of racemic and (+)-2-butanol on stereospecific silica gels. // *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* 1963. P. 228–234.
29. Sagiv J. Organized monolayers by adsorption. Irreversible adsorption and memory effects in skeletonized silane monolayers. // *Isr. J. Chem.* 1979. V. 18. No. 3–4. P. 346–353.
30. Sagiv J. Organized monolayers by adsorption. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. V. 102. No. 1. P. 92–98.
31. Kempe M., Glad M., Mosbach K. An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease A. // *J. Mol. Recognit.* 1995. V. 8. No. 1–2. P. 35–39.
32. Norrlöw O., Glad M., Mosbach K. Acrylic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates. // *J. Chromatogr.* 1984. V. 299. P. 29–41.

33. Hirayama K., Sakai Y., Kameoka K. Synthesis of polymer particles with specific lysozyme recognition sites by a molecular imprinting technique. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2001. V. 81. No. 14. P. 3378–3387.
34. Plunkett S.D., Arnold F.H. Molecularly imprinted polymers on silica: selective supports for high-performance ligand-exchange chromatography. // *J. Chromatog. A.* 1995. V. 708. No. 1. P. 19–29.
35. Gao D., Zhang Z., Wu M., Xie C., Guan G., Wang D. A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. No. 25. P. 7859–7866.
36. Sulitzky C., Rückert B., Hall A.J., Lanza F., Unger K., Sellergren B. Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiators. // *Macromolecules.* 2002. V. 35. No. 1. P. 79–91.
37. Tamayo F., Titirici M., Martin-Esteban A., Sellergren B. Synthesis and evaluation of new propazine-imprinted polymer formats for use as stationary phases in liquid chromatography. // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 542. No. 1. P. 38–46.
38. Fairhurst R., Chassaing C., Venn R.F., Mayes A.G. A direct comparison of performance of ground, beaded and silica-grafted MIPs in HPLC and turbulent flow chromatography applications. // *Biosens. Biotech.* 2004. V. 20. No. 6. P. 1098–1105.
39. Rückert B., Hall A.J., Sellergren B. Molecularly imprinted composite materials via iniferter-modified supports. // *J. Mater. Chem.* 2002. V. 12. P. 2275–2280.
40. Sellergren B., Ruckert B., Hall A.J. Layer-by-layer grafting of molecularly imprinted polymers via iniferter modified supports. // *Adv. Mater.* 2002. V. 14. No. 17. P. 1204–1208.
41. Su S., Zhang M., Li B., Zhang H., Dong X. HPLC determination of sulfamethazine in milk using surface-imprinted silica synthesized with iniferter technique. // *Talanta.* 2008. V. 76. No. 5. P. 1141–1146.
42. Barahona F., Turiel E., Cormack P., Martin-Esteban A. Chromatographic performance of molecularly imprinted polymers: core-shell microspheres by precipitation polymerization and grafted MIP via iniferter-modified silica beads. // *J. Polym. Sci. A.* 2010. V. 48. No. 1. P. 1058–1066.

43. Yilmaz E., Haupt K., Mosbach K. The use of immobilized templates – a new approach in molecular imprinting. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000. V. 39. No. 12. P. 2115–2118.
44. Yilmaz E., Ramström O., Möller P., Sanchez D., Mosbach K. A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates. // *J. Mater. Chem.* 2002. V. 12. P. 1577–1581.
45. Titirici M., Sellergren B. Peptide recognition via hierarchical imprinting. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. No. 8. P. 1913–1921.
46. Rachkov A., Minoura N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1544. No. 1–2. P. 255–266.
47. Kim T., Ki C., Cho H., Chang T., Chang J. Facile preparation of core-shell type molecularly imprinted particles: molecular imprinting into aromatic polyimide coated on silica spheres. // *Macromolecules.* 2005. V. 38. No. 15. P. 6423–6428.
48. Ki C.D., Oh C., Oh S-G., Chang J.Y. The use of thermally reversible bond for molecular imprinting of silica spheres. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. P. 14838–14839.
49. Zhang Y., Zhang Y., Qin Z., Ma Z. Synthesis of silica adsorbent and its selective separation for flavone. // *Front. Chem. China.* 2008. V. 3. No 3. P. 320–324.
50. Makote R., Collinson M.M. Template recognition in inorganic-organic hybrid films prepared by sol-gel process. // *Chem. Mater.* 1998. V. 10. No. 9. P. 2240–2445.
51. Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. // *Enzyme Microb. Technol.* 2007. V. 40. No. 6. P. 1451–1463.
52. Andersson L. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. // *J. Chromatogr. B.* 2000. V. 745. No. 1. P. 3.
53. Kandimala V., Ju H. Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 380. No. 4. P. 587.
54. Theodoridis G., Lasakova M., Skerikova V., Tegou A., Giantsiou N., Jandera P. Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: application in solid-phase

extraction for the sample pretreatment of natural products prior to HPLC analysis. // *J. Sep. Sci.* 2006. V. 29. No. 15. P. 2310–2321.

55. Qiao F., Sun H., Yan H., Row K.H. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. // *Chromatographia*. 2006. V. 64. No 11/12. P. 625–636.

56. Bjarnason B., Chimuka L., Ramstron O. On-Line solid-phase extraction of triazine herbicides using a molecularly imprinted polymer for selective sample enrichment. // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. No. 11. P. 2152–2156.

57. Moein M.M., Javanbakht M., Akbari-adergani B. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of human insulin in plasma and pharmaceutical formulations. // *Talanta*. 2014. V. 121. P. 30–36.

58. Moein M.M., Javanbakht M., Akbari-adergani B. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of dextromethorphan in human plasma samples. // *J. Chromatogr. B*. 2011. V. 879. No 11–12. P. 777–782.

59. Mullett W., Lai E. Determination of Theophylline in Serum by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction with Pulsed Elution. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. No. 17. P. 3636–3641.

60. Schreiber-Deturmeny E., Bruguerolle B. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of caffeine and theophylline for routine drug monitoring in human plasma. // *J. Chromatogr. B*. 1996. V. 677. No. 2. P. 305–312.

61. Zhou S.N., Lai E.P.C., Miller J.D. Analysis of wheat extracts for ochratoxin A by molecularly imprinted solid-phase extraction and pulsed elution. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. No. 8. P. 1903–1906.

62. Andersson L.I., Abdel-Rehim M., Niklasson L., Schweitz L., Nilsson S. Towards molecular-imprint based SPE of local anaesthetics. // *Chromatographia*. 2002. V. 55. No. 1. P. 65–69

63. Matsui J., Fujiwara K., Takeuchi T. Atrazine-Selective Polymers Prepared by Molecular Imprinting of Trialkylmelamines as Dummy Template Species of Atrazine. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. No. 8. P. 1810–1813.

64. Matsui J., Fujiwara K., Ugata S., Takeuchi T. Solid-phase extraction with a dibutylmelamine-imprinted polymer as triazine herbicide-selective sorbent. // *J. Chromatogr. A*. V. 889. 2000. No. 1–2. P. 25–31.
65. Mullett W.M., Dirie M.F., Lai E.P.C., Guo H., He X. A 2-aminopyridine molecularly imprinted polymer surrogate micro-column for selective solid phase extraction and determination of 4-aminopyridine. // *Anal. Chim. Acta*. 2000. V. 414. No. 1–2. P. 123–131.
66. Li J., Zhang X., Tong H., Xu Y., Liu S. Preparation of a hollow porous molecularly imprinted polymer using tetrabromobisphenol A as a dummy template and its application as SPE sorbent for determination of bisphenol A in tap water. // *Talanta*. 2013. V. 117. P. 281–287.
67. Kawaguchi M., Hayatsu Y., Nakata H., Ishii Y., Ito R., Saito K., Nakazawa H. Molecularly imprinted solid phase extraction using stable isotope labeled compounds as template and liquid chromatography–mass spectrometry for trace analysis of bisphenol A in water sample. // *Anal. Chim. Acta*. 2005. V. 539. No. 1–2. P. 83–89.
68. Men H-F., Liu H-Q., Zhang Z-L., Zhang J.H., Zhai Y-Y., Li L. Synthesis, properties and application research of atrazine Fe₃O₄/SiO₂ magnetic molecularly imprinted polymer. // *Environ. Sci. Pollut. Res*. 2012. V. 19. No. 6. P. 2271–2280.
69. Jin G., Li W., Yu S., Peng Y., Kong J. Novel superparamagnetic core-shell molecular imprinting microspheres towards high selective sensing. // *Analyst*. 2008. V. 133. P. 1367–1372.
70. Huang W., Yang X., Zhao S., Zhang M., Hu X., Wang J., Zhao H. Fast and selective recognizes polysacchride by surface molecularly imprinted film coated onto aldehyde-modified magnetic nanoparticles. // *Analyst*. 2013. V. 21. No 138. P. 6653–6661.
71. Khatiri R., Revhani A., Mortazavi S.Z., Hossainalipour M. Preparation and characterization of Fe₃O₄ / SiO₂ / APTES core-shell nanoparticles. // *Proceedings of the 4th International Conference on Nanostructures (ICNS4)*, 12-14 March, 2012, Kish Island, I. R. Iran. P. 1456–1458.

72. Lu A.-H., Salabas E.L., Schüth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. No. 8. P. 1222–1244.

73. Liu Y., Huang Y., Liu J., Wang W., Liu G., Zhao R. Superparamagnetic surface molecularly imprinted nanoparticles for water-soluble perfloxacin mesylate prepared via surface initiated atom transfer radical polymerisation and its application in egg sample analysis. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1246. P. 15–21.

74. Zhang Y., Liu R., Hu Y., Li G. Microwave heating in preparation of magnetic molecularly imprinted polymer beads for trace triazines analysis in complicated samples. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. No. 3. P. 967–976.

75. Lin Z., Cheng W., Li Y., Liu Z., Chen X., Huang C. A novel superparamagnetic surface molecularly imprinted nanoparticle adopting dummy template: An efficient solid-phase extraction adsorbent for bisphenol A. // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 720. P. 71.

76. Chen A., Zeng G., Chen G., Hu X., Yan M., Guan S., Shang C., Lu L., Zou Z., Xie G. Novel thiourea-modified magnetic ion-imprinted chitosan/TiO₂ composite for simultaneous removal of cadmium and 2,4-dichlorophenol. // *Chem. Eng.* 2012. V. 191. P. 85–94.

77. Xu C., Shen X., Ye L. Molecularly imprinted magnetic materials prepared from modular and clickable nanoparticles. // *J. Mater. Chem.* 2012. V. 22. P. 7427–7433.

78. Sun J., Zhou S., Hou P., Yang Y., Weng J., Li X., Li M. Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2007. V. 80A. No. 2. P. 333–341.

79. Feng B., Hong R.Y., Wang L.S., Guo L., Li H.Z., Ding J., Zheng Y., Wei D.G. Synthesis of Fe₃O₄ / APTES / PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging. // *Coll. Surf. A.* 2008. V. 328. No. 1–3. P. 52–59.

80. Ballesteros-Gomez A., Rubio S. Hemimicelles of alkyl carboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles: study and application to the extraction of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. No. 21. P. 9012–9020.

81. Lee S.-Y., Harris M.T. Surface modification of magnetic nanoparticles capped by oleic acids: Characterization and colloidal stability in polar solvents. // *J. Coll. Int. Sci.* 2006. V. 293. No 3. No. 2. P. 401–408.
82. Кубракова И.В., Кощеева И.Я., Пряжников Д.В., Мартынов Л.Ю., Киселева М.С., Тютюнник О.А. Микроволновой синтез, свойства и аналитические возможности наноразмерных сорбционных материалов на основе магнетита. // *Журн. аналит. химии.* 2014. Т. 69. № 2. С. 1–12.
83. Khoury J.M.El., Caruntu D., O'Connor C.J., Jeong K.-U., Cheng S.Z.D., Hu J. Poly(allylamine) stabilized iron oxide magnetic nanoparticles. // *J. Nanopart. Res.* 2007. V. 9. No. 5. P. 959–964.
84. Liao M.-H., Chen D.-H. Preparation and characterization of a novel magnetic nano-adsorbent. // *J. Mater. Chem.* 2002. V. 12. P. 3654–3659.
85. Chang Y.-C., Chen D.-H. Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions. // *J. Coll. Int. Sci.* 2005. V. 283. No. 2. P. 446–451.
86. Tatemichi M., Sakamoto M., Mizuhata M., Deki S., Takeuchi T. Protein-templated organic/inorganic hybrid materials prepared by liquid-phase deposition. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. No. 35. P. 10906–10910.
87. Inoue J., Ooya T., Takeuchi T. Protein imprinted TiO₂-coated quantum dots for fluorescent protein sensing prepared by liquid phase deposition. // *Soft Matter.* 2011. V. 7. P. 9681–9684.
88. Shen X., Zhu L., Liu G., Yu H., Tang H. Enhanced photocatalytic degradation and selective removal of nitrophenols by using surface molecular imprinted titania. // *Environ. Sci.* 2008. V. 42. No. 5. P. 1687–1692.
89. Yang D.-H., Takahara N., Lee S.-W., Kunitake T. Fabrication of glucose-sensitive TiO₂ ultrathin films by molecular imprinting and selective detection of monosaccharides. // *Sens. Actuat. B.* 2008. V. 130. No. 1. P. 379–385.
90. Lahav M., Kharitonov A.B., Katz O., Kunitake T., Willner I. Tailored chemisensors for chloroaromatic acids using molecular imprinted TiO₂ thin films on ion-sensitive field-effect transistors. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. No. 3. P. 720–723.

91. Lee S.-W., Ichinose I., Kunitake T. Molecular imprinting of azobenzene carboxylic acid by the surface sol-gel process. // *Langmuir*. 1998. V. 14. No. 10. P. 2857–2863.
92. Kunitake T., Lee S.-W. Molecular imprinting in ultrathin titania gel films via surface sol-gel process. // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 504. No. 1. P. 1–6.
93. Collinson M.M. Sol-gel strategies for the preparation of selective materials for chemical analysis. // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1999. V. 29. No. 4. P. 289–311.
94. Lafont R., Blais C., Harmatha J., Wilson I.D. Ecdysteroids: Chromatography. In: Wilson I.D., Adlard E.R., Cooke M., Poole C.F. (Eds.) *Encyclopedia of Separation Science*. London: Academic Press. P. 2631–2643.
95. Large T., Lafont R., Morgan E.D., Wilson I.D. Micellar Capillary Electrophoresis of ecdysteroids. // *Anal. Proc.* 1992. V. 29. P. 386–388.
96. Bathori M., Pongracz Z. Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans. // *Curr. Med. Chem.* 2005. V. 12. No. 2. P. 153–172.
97. Dinan L., Harmatha J., Lafont R. Chromatographic procedure for isolation of plant steroids. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 935. No. 1–2. P. 105–123.
98. Grebenok R.G., Ripa P.V., Adler J.H. Occurrence and levels of ecdysteroids in spinach. // *Lipids*. 1991. V. 26. No. 8. P. 666–668.
99. Dinan L., Savchenko T., Whiting P. On the distribution of phytoecdysteroids in plant. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. No. 8. P. 1121–1132.
100. Chadin I., Volodin V., Whiting P., Shirshova T., Kolegova N., Dinan L. Ecdysteroid content and distribution in plants of genus *Potamogeton*. // *Boichem. Syst. Ecol.* 2003. V. 31. No. 4. P. 407–415.
101. Budensky M., Vokac K., Harmatha J., Cvacka J. Additional minor ecdysteroid components of *Leusea carthamoides*. // *Steroids*. 2008. V. 73. No. 5. P. 502–514.
102. Meng Y., Whiting P., Zibareva L., Bertho G., Girault J.-P., Lafont R., Dinan L. Identification and quantitative analysis of the phytoecdysteroids in *Silene* species (Caryophyllaceae) by high-performance liquid chromatography. Novel ecdysteroids from *S. pseudotites*. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 395. No. 1–2. P. 309–319.

103. Bathori M., Kalasz H. Separation methods for ecdysteroids. // LC-GC Eur. October 2001. P. 2–7.
104. Liktor-Busa E., Simon A., Toth G., Fekete G., Kele Z., Bathori M. Ecdysteroids from *Serratula wolffii* roots. // J. Nat. Prod. 2007. V. 70. No. 5. P. 884–886.
105. Wainwright G., Prescott M.C., Lomas L.O., Webster S.G., Rees H.H. Development of a new high-performance chromatography – mass-spectrometric method for the analysis of ecdysteroids in biological extracts. // Arch. Insect Biochem. 1997. V. 35. No. 1–2. P. 21–31.
106. Bathori M., Gergely A., Kalász H., Nagy G., Dobos Á., Máthé I. Liquid Chromatographic Monitoring of Phytoecdysteroid production of *Serratula Wolfii*. // J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 2000. V. 23. No 2. P. 281–294.
107. Li Y., Warren J.T., Boysen G., Gilbert L.I., Gold A., Sangaiah R., Ball L.M., Swenberg J.A. Profiling of ecdysteroids in complex biological samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. // Rapid. Commun. Mass Spectrom. 2006. V. 20. No. 2. P. 185–192.
108. Wilson I.D., Morgan E.D., Lafont R., Wright B. High-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy. Application to the ecdysteroids of *Silene otitis*. // J. Chromatogr. A. 1998. V. 799. No. 1–2. P. 333–336.
109. Wilson I.D., Morgan E.D., Lafont R., Shockcor J.P., Lindom J.C., Nickolson J.K., Wright B. High-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry applied to plant products: identification of ecdysteroids from *Silene otitis*. // Chromatographia. 1999. V. 49. No. 7. P. 374–378.
110. Bathori M. Phytoecdysteroids effects on mammals, isolation and analysis. // Mini Rev. Med. Chem. 2002. V. 2. No. 3. P. 285–293.
111. Bathori M. Purification and characterization of plant ecdysteroids of *Silene* species. // Trends Anal. Chem. 1998. V. 17. No. 6. P. 372–383.
112. Murphy S.J., Morgan E.D., Wilson I.D. A note on selective separation of 20,22-dihydroxyecdysteroids from insect and plant material with immobilized phenylboronic acid. // Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones. Chrom. Ser. Symp. 1991. P. 131–136.

113. Morgan E.D., Marco M.P. Advances in techniques for ecdysteroid analysis. // *Invertebr. Reprod. Dev.* 1990. V. 18. No. 1-2. P. 55–56.
114. Wilson I.D., Morgan E.D., Murphy S.J. Sample preparation for the chromatographic determination of ecdysteroids using solid-phase extraction methods. // *Anal. Chim. Acta.* 1990. V. 236. P. 145–155.
115. Pis J., Hykl J., Budesinsky M., Harmatha J. Cyclic phenylboronates of ecdysteroids as products of regiospecific reaction with phenylboronic acid. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1993. V. 58. P. 612–618.
116. Shim J.-H., Wilson I.D., Morgan E.D. Boronic esters as derivatives for supercritical fluid chromatography of ecdysteroids. // *J. Chromatogr. A.* 1993. V. 639. No. 2. P. 281–285.
117. Pis J., Hykl J., Vaisar T., Harmatha J. Rapid determination of 20-hydroxyecdysteroids in complex mixtures by solid-phase extraction and mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 658. No. 1. P. 77–82.
118. Pis J., Harmatha J. Phenylboronic acids as a versatile derivatisation agent for chromatography of ecdysteroids. // *J. Chromatogr.* 1992. V. 596. No. 2. P. 271–275.
119. Vaisar T., Pis J. Cyclic boronates in mass spectrometry of ecdysteroids. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993. V. 7. No. 1. P. 46–52.
120. Gildengorn V.D. Reserved-phase affinity chromatography of ecdysteroids with boronic acid-containing eluents. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 730. No. 1-2. P. 147–152.
121. Destrez B., Pinel G., Bichon E., Monteau F., Lafont R., Le Bizec B. Detection of 20-hydroxyecdysone in calf urine by comparative liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry measurements: application to the control of the potential misuse of ecdysteroids in cattle. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. V. 22. No. 24. P. 4073–4080.
122. Schilke K.F. Activation of Immobilized lipase in non-aqueous systems by hydrophobic poly-DL-tryptophan tethers. // *Biotechnol. Bioeng.* 2008. V. 101. No. 1. P. 9-18.

123. Lei Y., Wang T., Mitchell J. W., Chow L. C. Immobilization of xanthate agent on titanium dioxide and surface initiated RAFT polymerization. // *J. Basic Clin. Med.* 2014. V. 3. No. 1. P. 1–3.
124. Ngo V.G., Bressy C., Leroux C., Margailan A. Synthesis of hybrid TiO₂ nanoparticles with well-defined poly(methylmethacrylate) and poly(tert-butyltrimethylsilyl methacrylate) via the RAFT process. // *Polymer.* 2009. V. 50. No. 14. P. 3095–3102.
125. Wu J., Fu X., Xie C., Yang M., Fang W., Gao S. TiO₂ nanoparticles-enhanced luminol chemiluminescence and its analytical applications in organophosphate pesticide imprinting. // *Sens. Actuat. B.* 2011. V. 160. No. 1. P. 511–516.
126. Liu L., Chen H., Yang F. Enhancing membrane performance by blending ATRP grafted PMMA–TiO₂ or PMMA–PSBMA–TiO₂ in PVDF. // *Sep. Purif. Technol.* 2014. V. 133. P. 22–31.
127. Volodin V., Alexeeva L., Kolegova N., Sarker S., Sik V., Lafont R., Dinan L. Further ecdysteroids from *Serratula coronata* L. (Asteraceae). // *Biochem. Syst. Ecol.* 1998. V. 26. No 4. P. 459–461.
128. Kokoska L., Janovska D. Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review. // *Phytochem.* 2009. V. 70. No. 7. P. 842–855.
129. Giraudi G., Giovannoli C., Tozzi C. Molecular recognition properties of peptide mixtures obtained by polymerization of amino acids in presence of estradiol. // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 481. No 41. No. 1. P. 41–53.
130. Alem H., Duwez A.S., Lussis P., Lipnik P., Jonas A.M., Demoustier-Champagne S. Microstructure and thermo-responsive behavior of poly(N-isopropylacrylamide) brushes grafted in nanopores of track-etched membranes. // *J. Membr. Sci.* 2008. V. 308. No. 1–2. P. 75–86.
131. Lee S.-W., Takahara N., Korposh S., Yang D.-H., Kunitake T. A Novel Mass-Sensitive Sensor based on β -Cyclodextrin-Anchored Bisphenol A – Imprinted TiO₂ Ultrathin Layers. // *Sens. Mater.* 2011. V. 23. No. 4. P. 229–236.