ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Каличкина Людмила Евгеньевна

Разработка методик аналитического контроля целевых и побочных продуктов

в синтезе 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона

1.4.2 – Аналитическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук,

Мальков Виктор Сергеевич

Оглавление

Введение
Глава 1. Литературный обзор7
1.1 Продукты взаимодействия тиомочевины и глиоксаля7
1.2 Общие сведения о строении 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и его производных 8
1.3 Методы исследования 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и его производных 10
1.4 Разделение и анализ геометрических изомеров методами жидкостной хроматографии 14
1.5 Методы количественного анализа тиомочевины
Глава 2. Общая характеристика объектов и методов исследования
2.1 Оборудование
2. 2 Реагенты
2.3 Методы исследования объектов
Глава 3. Обсуждение результатов
3.1 Исследование тион-тиольной таутомерии тиомочевины методом УФ-спектроскопии в
водно-спиртовых растворах
3.2 КР-спектроскопия тиомочевины, 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и глиоксаля 30
3.3 Идентификация продуктов взаимодействия тиомочевины с глиоксалем методом
ЯМР-спектроскопии
3.4 Методы жидкостной хроматографии для определения тиомочевины и геометрических
изомеров 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона
3.5 Применение ВЭЖХ методики определения тиомочевины, геометрических изомеров ДГИТ и
результатов ЯМР-спектроскопии для исследования пути протекания реакции между
тиомочевиной и глиоксалем
Выводы
Список сокращений и условных обозначений 83
Список использованной литературы
Приложение А. Расчет метрологических характеристик методик по РМГ 61 201094

Введение

Актуальность темы исследования. Имидазолидин-2-тионы и их комплексы с переходными металлами различного строения прежде всего привлекают пристальное внимание исследователей в связи с установленными видами биологической активности. Кроме того, 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тионы (ДГИТ) являются важными синтетическими предшественниками надмолекулярных структур семитиогликолурилов И семитиобамбусурилов, перспективных для применения в биомедицине, наноэлектронике, катализе и других областях. Наличие серы в структуре этих соединений, в отличие от кислородсодержащих аналогов, позволяет использовать их для терапии каналопатий. Наряду с этим, 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тионы являются эффективными ингибиторами кислотной коррозии стали.

4,5-Дигидроксиимидазолидин-2-тион и его производные получают взаимодействием соответствующих тиомочевин и глиоксаля в присутствии водорастворимых спиртов, при этом образуется смесь иис- и транс- изомеров, однако побочные продукты приводятся только для дифенилпроизводных ДГИТ. Известно, что положение гидроксильных групп относительно кольца имидазолидин-2-тиона влияет на упаковку супрамолекулярных структур, в связи с чем необходим количественный контроль содержания геометрических изомеров в смеси, а также других сопутствующих примесей в реакции образования ДГИТ. В литературе информация о методах количественного анализа ДГИТ отсутствует. Поэтому, вышесказанное делает актуальным разработку методик идентификации и определения геометрических изомеров ДГИТ. Для реализации синтеза ДГИТ в промышленности и конструирования промышленных аппаратов необходимо знать кинетические параметры направления процесса. Одним из способов изучения кинетики реакций является математическое моделирование. Для подтверждения рассчитанной модели помимо методик анализа ДГИТ и идентификации побочных продуктов необходимы методики анализа реагента – тиомочевины. В литературе представлено несколько методов количественного определения тиомочевины – титриметрические, спектроскопические, спектрофотометрические, электрохимические и хроматографические. Почти все перечисленные выше методы обладают высокой чувствительностью и селективностью, однако из-за сложной матрицы в синтезе 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона они не подходят для определения тиомочевины в реакции с глиоксалем, поэтому также актуальна задача разработки методики определения тиомочевины в синтезе ДГИТ.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в разработке методик идентификации и количественного определения целевых и побочных продуктов взаимодействия тиомочевины и глиоксаля в синтезе 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона.

Для достижения цели, необходимо было решить следующие задачи:

1) Выявить влияние природы растворителя (смеси водно-спиртовых растворов: с использованием метанола, этанола, пропанола-1, пропанола-2) и pH реакционной среды на тион-тиольную таутомерию тиомочевины с применением УФ-спектроскопии.

2) Разработать методики определения тиомочевины, смеси *цис-* и *транс-*4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона в реакции между глиоксалем и тиомочевиной с использованием КР-спектроскопии *in situ*.

3) Разработать ТСХ методики разделения и определения *цис-* и *транс-*4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, и их *N*,*N*'-диметилпроизводных с использованием видеоденситометрии.

4) Разработать ВЭЖХ методику определения тиомочевины, *цис-* и *транс-*4,5-дигидроксимимидазолидин-2-тиона в реакционной смеси.

5) Идентифицировать целевые и побочные продукты реакции тиомочевины с глиоксалем методом ЯМР-спектроскопии.

6) Предложить схему реакции взаимодействия тиомочевины с глиоксалем и определить кинетические параметры отдельных стадий.

Научная новизна. Впервые предложен метод контроля реакции между тиомочевиной и глиоксалем с использованием КР-спектроскопии *in situ*. Использование полосы зонда при 790 см⁻¹ в качестве внутреннего стандарта позволило разработать методику определения тиомочевины в реакции получения 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона.

Разработан метод аналитического контроля реакции образования *цис-* и *транс-* 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с применением ВЭЖХ. Метод основан на определении тиомочевины и геометрических изомеров ДГИТ в реакционной смеси, разбавленной ацетонитрилом, с использованием водной нормально-фазовой жидкостной хроматографии.

Впервые методом TCX разделены и идентифицированы *цис-* и *транс-*изомеры 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и его *N*,*N*'-диметилпроизводные с использованием модифицированных ацетатом кальция пластин для TCX (Sorbfil ПTCX-A-B-УФ). С применением видеоденситометрии разработана методика определения *транс-*4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона в смеси с *цис-*4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тионом.

С использованием ЯМР-спектроскопии идентифицированы целевые и побочные продукты реакции тиомочевины с глиоксалем. Установлено, что побочными продуктами являются кислородсодержащие аналоги ДГИТ – смесь геометрических изомеров

4,5-дигидроксиимидазолидин-2-она, а также 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тион. Предложен способ идентификации тиомочевины, имидазолидин-2-онов и -2-тионов по значению изотопных сдвигов дейтерия (ДИС).

Впервые исследована кинетика реакции тиомочевины с глиоксалем с использованием ВЭЖХ. Предложена схема реакции, рассчитаны кинетические параметры модели. Модель удовлетворительно описывает кинетику образования ДГИТ и расхода тиомочевины.

Практическая значимость. Разработанная ВЭЖХ методика определения была использована для установления концентраций тиомочевины, *цис- и транс-Д*ГИТ в реакционной массе, для исследования кинетики процесса образования ДГИТ из тиомочевины и глиоксаля. Предложенная схема реакции и рассчитанные кинетические параметры отдельных стадий могут быть использованы при моделировании технологических процессов и реакционного оборудования получения 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона.

Разработанные методики разделения геометрических изомеров ДГИТ могут быть использованы на фармацевтических предприятиях, научно-исследовательскими лабораториями для контроля качества ДГИТ при получении супрамолекулярных структур.

Установленная схема образования побочных продуктов для органиков-синтетиков позволяет предположить новую стратегию синтеза 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тиона из тиомочевины и 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона.

Актуальность, цель и задачи работы определены автором совместно с научным руководителем. **Личный вклад автора** заключается в планировании и проведении экспериментов, получении и интерпретации данных, обработке результатов исследований, подготовке публикаций и текста диссертации. Работа выполнена автором или при непосредственном участии автора. Разработка условий разделения геометрических изомеров ДГИТ с использованием ВЭЖХ выполнялась Мамко К. Е. (ТГУ), регистрация ЯМР-спектров проводилась Котельниковым О. А. (ТГУ), расчет кинетических параметров синтеза ДГИТ был проведен Новиковым Д. В. (ТГУ).

Положения, выносимые на защиту:

1. Методика определения тиомочевины в реакции образования 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с использованием КР-спектроскопии *in situ*;

2. Методика TCX разделения и определения *цис*- и *транс*-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с применением видеоденситометрии;

3. Условия ТСХ разделения *цис*- и *транс*-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и их *N*,*N*'-диметилпроизводных (влияние природы аналита, состава подвижной и неподвижной фаз на разделение);

5

4. Результаты идентификации целевых и побочных продуктов взаимодействия тиомочевины с глиоксалем методом ЯМР-спектроскопии;

5. Методика определения тиомочевины, *цис-* и *транс-*4,5-дигидроксиимидазолидин-2тиона в реакции между тиомочевиной и глиоксалем с использованием ВЭЖХ.

Достоверность результатов работы подтверждается соответствием результатов, полученных при использовании нескольких независимых методов анализа. Работа проводилась на поверенном современном аналитическом оборудовании. Выполнена оценка метрологических характеристик методик. Методики анализа использовались для изучения кинетики реакции взаимодействия тиомочевины с глиоксалем.

Апробация результатов. Результаты работ представлены на XXXII Всероссийском симпозиуме молодых ученых по химической кинетике (Москва, 2014), на XIII и XIX Международной конференции студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2014 и 2022), на Международной научно-практической конференции «Интеграция науки, образования и производства – основа реализации Плана нации» (Сагиновские чтения №12) (Караганда, 2020), XXII Всероссийской конференции молодых учёных по математическому моделированию и информационным технологиям (Новосибирск, 2021).

Публикации по результатам работы. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, входящих в наукометрические базы данных Scopus и Web of Science, 1 статья в прочем зарубежном журнале, а также 5 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских конференций и симпозиума, получено 2 патента Российской Федерации.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030), проект № 2.0.14.22 ОНГ «Экспериментальные и теоретические исследования гетероциклических соединений, имеющих имидазольный скелет: от прекурсоров к макро- и супрамолекулярным системам», 01.09.2022 – 31.12.2023 г.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Продукты взаимодействия тиомочевины и глиоксаля

Реакцией между тиомочевиной и глиоксалем в зависимости от условий синтеза [1], преимущественно получают смесь геометрических изомеров ДГИТ относительно имидазолидинового цикла (Рисунок 1). Установлено, что соотношение изомеров в этой реакции зависит от условий протекания процесса, однако преимущественно образуется *транс*-изомер 1а. Вследствие хорошей растворимости в воде *цис*-изомера ДГИТ 16, чистый *транс*-изомер 1а можно получить промывая его большим количеством воды, тогда как для увеличения количества *цис*-изомера 16 реакцию проводят в водно-спиртовых растворах.



Рисунок 1- Реакция взаимодействия тиомочевины и глиоксаля

В качестве побочных продуктов, в кислой среде образуются мочевина **26** и 1,3-дигидро-2-*H*-имидазол-2-тион **2**в, а также при температуре выше 60 °C и pH менее 2 образуется бициклический продукт 1,4-диаза-3,6-дитиабицикло[3.3.0]октан-2,5-диимин **2**а (Рисунок 2) [2].



Рисунок 2 – Побочные продукты реакции взаимодействия тиомочевины и глиоксаля в кислой среде

Пути образования продуктов **26** и **2**в (Рисунок 2) в литературе не объяснены. Образование вещества **2**а в качестве побочного продукта, указывает на взаимодействие глиоксаля с тиомочевиной, где реакционным центром является тионная группа. Такой тип взаимодействия

возможен за счёт тион-тиольной таутомерии тиомочевины. Поэтому важным условием образования тех или иных продуктов при взаимодействии тиомочевины с глиоксалем является, то в какой таутомерной форме тиомочевина находится в растворе.

Известно, что тиомочевина в растворе находится в равновесии между тионной (**3a**) и тиольной (**3б**) формой (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Тион-тиольная таутомерия тиомочевины в растворе

Как правило, данные формы **3a** и **36** не устойчивы и находятся в равновесии, которое зависти от многих факторов, но наибольшее влияние оказывает pH среды [3] и природа растворителя [4]. Явление тион-тиольной изомерии изучено с применением ЯМР [5], ВЭЖХ-МС, ГХ-МС [6], ИК-спектроскопии [7], УФ-спектроскопии [8], и методом дифракции [9]. Однако до сих пор не изучено влияние условий синтеза ДГИТ на процесс тион-тиольной таутомерии тиомочевины. Одним из самых простых, и информативных методов является УФ-спектроскопия, которая позволяет без дополнительной пробоподготовки установить преобладание одной из форм тиомочевины в растворе. Процесс получения ДГИТ ведут в водно-спиртовой среде, что послужило основанием для рассмотрения влияния данных типов растворителя на равновесие таутомерии (Рисунок 3), с целью определения оптимальных условий проведения процесса получения ДГИТ. Результаты проведенных нами исследований указаны в разделе 3.1.

1.2 Общие сведения о строении 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и его производных

Методом рентгенодифракционного анализа было установлено, что гидроксильные группы ДГИТ в *транс*-положении характеризуются торсионным углом в 139,6°. Имидазолидиновое кольцо принимает конформацию конверта с атомом C(5), отклонившимся на 0,328Å от плоскости, проходящей через другие атомы. Атомы азота в молекуле не эквивалентны, N(2) находится вблизи плоскости кольца, тогда как второй атом азота N(4) находится в пирамидальной форме и отклонение от плоскости составляет 0,201Å (Рисунок 4) [1].



Рисунок 4 – Общий вид молекулы 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона

Неэквивалентность атомов азота, объясняется особенностями упаковки кристаллов. Группы -NH и -C=S участвуют в образовании водородных связей разной силы с атомами кислорода гидроксильной группы, которые связывают молекулы в бесконечные двойные цепи (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Фрагмент упаковки кристалла 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, иллюстрирующий образование водородных связей: N–H…O (**a**) и O–H…S (**б**)

N,*N*'-диметилДГИТ имеет твист-конформацию, ОН-группа участвует в образовании водородной связи с группой -C=S, также образуя бесконечные Н-связанные цепи [10].

В молекуле ДиФДГИТ (Рисунок 6) пятичленное кольцо (N1, N2/C1–C3) принимает конформацию со смещением атома C3 на 0,369Å от плоскости остальных атомов имидазолидин-2-тионового кольца [11]. Две гидроксильные группы лежат по разные стороны кольца, что соответствует *транс-*ДиФДГИТ. Длины связи C1–N1=1,357Å и C1–N2=1,373Å длиннее, чем соответствующие связи в *транс-*4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тионе, со значением равным 1,335 и 1,336Å, соответственно. Однако, длины связей C1=S1 со значением

1,669Å и C2–C3 равное 1,526Å в ДиФДГИТ короче, чем соответствующие связи в незамещенном ДГИТ, с длинами связей 1,684 и 1,537Å, соответственно. Бензольные кольца C4–C9 и C10–C15, плоские и ориентированы относительно имидазолидин-2-тионового кольца под углом равным 22,63°. Между тионной и гидроксильными группами разных молекул ДиФДГИТ образуются водородные связи O–H…S и O–H…O, которые связывают молекулы в двумерную сетку и приводят к стабилизации структуры.



Рисунок 6 – Строение транс-дифенил-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона

Так как при синтезе ДГИТ получается смесь *цис-и транс-*изомеров, то одной из задач является их разделение и идентификация, поэтому следующий раздел посвящён методам исследования ДГИТ.

1.3 Методы исследования 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и его производных

Спектроскопические методы исследования применяются для анализа и подтверждения структуры ДГИТ и его производных. Для этого используют, спектроскопию инфракрасной области (ИК), спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрию (МС).

ИК-спектроскопия применяется для идентификации структуры ДГИТ и его производных, по спектральным полосам поглощения, которые могут быть отнесены к функциональным группам. Однако из-за наличия нескольких характеристических групп, находящихся в одной области спектра и перекрывающихся полос между собой, описание в литературе встречается в единичных случаях. При анализе ДГИТ и его производных используется спектроскопия в среднем ИК-диапазоне. Полосы поглощения в области 3300–3400 см⁻¹ соответствуют деформационным колебаниям гидроксильных групп. Область 3150–3250 см⁻¹ и полоса поглощения при 1617 см⁻¹, относятся к деформационным и валентным колебаниям -NH-группы,

соответственно. Полоса поглощения при 1474 см⁻¹соответствует валентным колебаниям -C-Nгруппы, а полоса при 1414 см⁻¹ относится к тионной группе ДГИТ [2].

В ИК-спектрах производных ДГИТ, помимо перечисленных полос поглощения, наблюдаются полосы поглощения, относящиеся к колебаниям заместителей. Так, ДиФДГИТ имеет полосы поглощения в области 3030 см⁻¹, 1600–1595 см⁻¹, валентное колебание -С-Н ароматического кольца. Область 2890–2900 см⁻¹ относится к колебаниям метильных и метиновых групп, для алкильных производных ДГИТ [12].

Одним из основных недостатков метода является невозможность анализировать смеси химически родственных и близких по строению веществ. Поэтому ИК-спектроскопия ДГИТ малопригодна для анализа геометрических изомеров ДГИТ и его производных.

Перспективным методом анализа и хорошим дополнением к ИК-спектроскопии является КР-спектроскопия. Спектроскопия комбинационного рассеяния дает информацию о внутри- и межмолекулярных колебаниях в молекуле. Информация о внутримолекулярных колебаниях позволяет идентифицировать вещества. Данные о межмолекулярных колебаниях в молекуле отражают структуру кристаллической решетки и полиморфную форму. В литературе не описано применение КР-спектроскопии для анализа ДГИТ и его производных. Однако методом комбинационного рассеяния исследован прекурсор ДГИТ – тиомочевина, поэтому этот метод может быть перспективным для исследования процесса получения ДГИТ из тиомочевины и глиоксаля. Мониторинг реакции с использованием КР-спектроскопии [13, 14, 15, 16], находит широкое применение как в научно-исследовательских целях, также при расчете и конструировании оборудования в промышленности, вследствие минимального воздействия на анализируемую систему, получение результата В реальном времени, отсутствие пробоподготовки. По причине того, что Рамановская спектроскопия нечувствительна к полосам поглощения, процесс непосредственного измерения можно проводить в различных средах (твёрдых, жидких, газообразных), а также измерения через прозрачные материалы, например, стекло, кварц, пластмассу. Ещё одним преимуществом использования КР-спектроскопии для мониторинга реакции получения ДГИТ является индифферентность метода к водной среде, в которой протекает процесс синтеза.

Несмотря на свой несомненный потенциал, использование КР-спектроскопии для количественного мониторинга реакции в реальном времени все еще довольно ограничено, вследствие флуоресценции, нестабильного значения мощности лазера. Предложены различные подходы, которые позволяют определять концентрацию реагентов, участвующих в реакции. Наиболее широко используемый метод – нормализация исследуемых полос по внутреннему стандарту, который часто выбирают из полосы растворителя или полосы вещества, которая остается постоянной во времени [15, 16].

ЯМР-спектроскопия является одним из основных методов идентификации и подтверждения структуры ДГИТ и его производных. Метод позволяет идентифицировать геометрические изомеры имидазолидин-2-тионов. Так, на спектрах ¹Н ЯМР ДГИТ сигналы протонов метиновой группы *транс*-изомеров, со значением 4,7 м.д., находятся в более сильном поле по сравнению с подобными сигналами *цис*-изомеров со значением 5,0 м.д., аналогичная закономерность наблюдается для протонов гидроксильных групп со значением для *транс*-изомера со значением в более слабое поле относительно аналогичных сигналов для *цис*-изомера со значением 8,84 м.д. и 8,66 м.д., соответственно. Такая же зависимость наблюдается в спектрах ¹³С ЯМР, в которых сигналы атомов углерода метиновой группы и -C=S лежат в более слабом поле для *транс*-изомера со значением 87,2 м.д. и 182,0 м.д., а для *цис*-изомера 79,9 м.д. и 181,3 м.д, соответственно [10]. Аналогичная закономерность прослеживается для всех производных ДГИТ.

ЯМР ¹³С анализ применялся для исследования механизма реакции между бензилом и тиомочевиной в щелочной и кислой средах в режиме онлайн [17]. Было установлено, что в кислой среде соответствующий ДГИТ является промежуточным продуктом, а основными продуктами являются соединение **7a** (1,3-диметил-4,5-дифенил-1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тион), бициклический продукт **76** и 1,3-диметилмочевина (Рисунок 7).



Рисунок 7 – Реакция 1,3-диметилтиомочевины с бензилом в кислой среде

Авторами предложен механизм преобразования ДГИТ в соответствующие продукты (Рисунок 8). В кислой среде происходит протонирование одной из гидроксильных групп ДГИТ, что приводит к дегидратации, также происходит атака другой гидроксильной группы нуклеофильным агентом – тиомочевиной, все это приводит к образованию неустойчивого циклического продукта **8**г (Рисунок 8). Разложение циклического продукта **8**г происходит до соединения **8**д и соответствующей мочевины **8**в, как хорошей уходящей группы. Соединение **8**д

неустойчиво и подобно тиирану распадается с образованием элементарной серы и 1,3-диметил-4,5-дифенил-1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тиона **8а**.



Рисунок 8 – Механизм преобразования 4,5-дигидрокси-1,3-диметил-4,5дифенилимидазолидин-2-тиона в кислой среде

Таким образом, метод ЯМР-спектроскопии является надежным инструментом для идентификации геометрических изомеров ДГИТ и его производных, а также для исследования механизма образования ДГИТ.

Метод масс-спектрометрии широко применяется для идентификации ДГИТ и его производных. Масс-спектрометрия высокого разрешения является полезным инструментом для анализа сложных матриц образцов, и позволяет обнаруживать аналиты с точностью до 0,001 а.е.м. Масс-спектры ДГИТ и его О-метильного производного регистрировали на времяпролетном спектрометре Waters Micromass LCT Premier Mass Spectrometer, анализ проводили прямым вводом, то есть без предварительного разделения. Ионизацию аналитов осуществляли электроспреем. Пробы растворяли в смеси ацетонитрил:вода (7:3, объемн.). В результате анализа получили соответствующие молекулярные ионы ДГИТ ($C_3H_7N_2O_2S$ [M^+H]⁺)=135.0226 а.е.м и его диэтилового эфира ($C_5H_{10}N_2O_2S$ [M^+H]⁺)=163.0529 [2].

Одним из недостатков метода является то, что из-за фрагментации аналитов в большинстве случаев удается интерпретировать только масс-спектры чистых веществ. Молекулярные ионы геометрических изомеров ДГИТ идентичны, поэтому данный метод не применяется для их идентификации без предварительного разделения или идентификации другим методом.

Спектроскопические методы анализа подходят для анализа и идентификации чистых веществ. Однако в результате синтеза ДГИТ образуется смесь геометрических изомеров, это не позволяет анализировать полученную смесь без их предварительного разделения. Известно, что одним из методов разделения геометрических изомеров является жидкостная хроматография. Поэтому следующая часть обзора посвящена рассмотрению разделения геометрических изомеров с помощью жидкостной хроматографии. Так как в молекуле ДГИТ геометрическая изомерия обусловлена расположением гидроксильных групп относительно имидазолидин-2-тионового кольца. В данном обзоре рассмотрено разделение геометрических изомеров гидроксилсодержащих соединении, где в качестве модели использовали сахара, а также кислородсодержащий аналог ДГИТ – 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-он.

1.4 Разделение и анализ геометрических изомеров методами жидкостной хроматографии

Метод тонкослойной хроматографии используется для разделения и анализа геометрических изомеров достаточно широко. С помощью ТСХ могут быть разделены цис- и транс- изомеры органических веществ, которые не удалось разделить другими методами.

Авторы описывают разделение смеси, состоящей из сахарозы, лактозы, арабинозы и глюкозы на силикагельных пластинках для TCX [18]. Для этого пластины предварительно пропитывали борной кислотой, в качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей хлороформ:метанол:вода:гидроксид аммония (120:75:6:2, объемн.). Борная кислота образует комплексы с углеводами с разным значением R_f, что позволяет их разделить.

В работе [19] показана возможность разделения и идентификации моно- и дисахаридов на модифицированных солями двухвалентных металлов (Cu, Ni, Zn, Cd) пластинах TCX с целью отслеживания патогенеза и прогресса сахарного диабета. Модификацию проводили путем погружения пластин с силикагелем в растворы солей с концентрацией 0,5 масс.% на 0,5 мин, далее высушивали при 60 °C в течение часа, перед использованием пластины промывали элюентом и снова сушили при тех же условиях. В качестве элюента использовали смеси н-пропанол:вода (8:4, объемн.) и изопропанол-вода (8:4, объемн.).

Возможность сахаров образовывать комплексы с Cu (II), использовали для их разделения на TCX пластинках пропитанными этими солями. Проявление пластин осуществлялось с помощью опрыскивания раствором перманганата калия в присутствии гидроксида натрия. Авторами проведена оптимизация условий модифицирования пластин для TCX на основе силикагеля солями металлов. Для этого были выбраны окрашенные соли Cu (I, II), Co (III), что позволило отследить равномерность покрытия и эффективность их десорбции на поверхности силикагеля [20]. Коммерческие пластины: Kieselgel 60 F₂₅₄ (10×10 см) производства Merck (Дармштадт, Германия), предварительно промывали метанолом. Модификацию проводили в стеклянном сосуде путем погружения пластин в раствор солей с различными концентрациями. После нанесения соли пластины погружали на несколько секунд в дистиллированную воду для удаления избытка соли, затем сушили при 110 °C в течение 1 часа и элюировали 1М соляной кислотой. Количество адсорбированного металла определяли методом АЭС.

Известно, что катионы металлов (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+}) могут быть распределены в объеме силикагеля в форме изолированных катионов и не влиять на свойства поверхностных силанольных групп силикагеля и хроматографические параметры пластины. При увеличении количества катионов могут формироваться приповерхностные центры (катионы металлов), которые влияют на увеличение кислотности соседних силанольных групп (кислотные центры Льюиса). Также, катионы металлов на поверхности силикагеля могут менять характер активных центров на поверхности силикагеля вследствие наличия свободных орбиталей, способных создавать межмолекулярные связи с молекулами растворителя и аналитами во время хроматографирования [21]. Последняя группа легко получается введением модификаторов на поверхность силикагеля преимущественно за счет ионообменного характера силанольных групп с катионами металлов. Для очистки поверхности хроматографических пластин от введенных катионов металлов используют экстракцию кислотой или растворами ЭДТА.

В работе [22] описан способ ТСХ разделения энантиомеров атенолола и пропранолола (блокирующие агенты) и сальбутамола (бронхо- и вазодилататоры) с использованием коммерческих пластин предварительно обработанных комплексами меди (II) с аминокислотами (пролином, фенилаланином, гистидином, *N*,*N*-диметил-1-фенилаланином и 1-триптофаном) в нормально-фазовом режиме. Использовали 3 разных подхода: 1) комплекс меди с аминокислотой добавляют в подвижную фазу в качестве хиральной добавки; 2) обработка коммерческих пластин восходящим способом раствором комплекса меди с аминокислотой; 3) обработка пластин восходящим методом растворами аминокислот и добавка в подвижную фазу ацетата меди. Проявление пластин осуществляли в йодной камере. Предел обнаружения составляет 0,18 г для каждого энантиомера. Данный подход позволил разделить все энантиомеры с высоким разрешением.

Прекурсор ДГИТ – тиомочевина, из-за высокого дипольного момента широко используется в качестве лиганда в комплексных соединениях с различными металлами. В литературе описаны комплексы разного состава и строения тиомочевины с магнием, кадмием,

калием, кальцием, медью, железом [23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31]. Пример образования комплекса представлен на рисунке 9.



Рисунок 9 – Схема образования комплекса тиомочевины с кальцием

В литературе [32] описаны комплексы ДГИТ и его производных с медью (I) и серебром.



Рисунок 10 – Комплексы 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с медью (а), серебром (б)

Таким образом метод TCX с модификацией пластин солями металлов можно считать перспективным для определения и разделения тиомочевины, ДГИТ и их производных.

Метод ВЭЖХ используют для разделения геометрических изомеров, так анализ ДГИ, осуществляли на колонке Aminex HPX-87H 300×7,8 мм при температуре 30 °C, давлении 1 атм., скорости потока 0,5 мл/мин, объема инжекции 100 мкл и подвижной фазы 0,03 М фосфорной кислоты (чистота для ВЭЖХ). В качестве примесей в ДГИ присутствуют гликолурил и мочевина [33].

Некоторые углеводы, такие как рибоза, арабиноза и рибулоза обладают уникальной способностью образовывать комплексы с борной кислотой, что используется для анализа их смеси с применением ВЭЖХ в режиме ионно-эксклюзионной хроматографии [34].

Разделение углеводов проводят с использованием ионообменной хроматографии. Сахара, как слабые электролиты, слабо взаимодействуют с анионообменными смолами в водной среде. Для улучшения удерживания сахаров на ионообменных смолах проводят их модификацию борной кислотой [35]. Для катионообменных смол механизм удерживания углеводов включает смесь различных эффектов: лигандный обмен, механизм эксклюзии, комплексообразование, иондипольные взаимодействия и водородный связи [36]. Авторы [37] исследовали влияние катионообменных смол с ионами Ca^{2+} , Na^+ и K^+ на механизм удерживания сахаров. Катионообменных смола с K^+ , имела более сильное поглощение сахаров, чем смола, насыщенная Na^+ . K^+ больше подходит для отделения глюкозы от олигосахаридов, тогда как Ca^{2+} лучше для отделения фруктозы от олигосахаридов. Установлено, что лиганднообменный механизм хроматографирования преобладает в щелочных средах. Сила взаимодействия аналита с неподвижной фазой зависит от размера катиона, а также от формы и гибкости комплексообразующей молекулы [38, 39, 40].

Разделение производных ДГИТ проводили методом ВЭЖХ на хиральной колонке CHIRALCEL IA. В качестве элюента использовали н-гексан:пропанол-2 (80:20, объемн.), со скоростью потока 0,6 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 254 нм. В выбранных условиях время удерживания соединения **11a** составляет 9,1 мин и его оптического изомера – 8,87 мин. В тех же условиях время удерживания соединения соединения **11b** с временем удерживания 10,48 мин, а для его стереоизомера 17,00 мин; для соединения **11b** время удерживания 8,37 мин, а для оптического изомера – 38, 34 мин (Рисунок 11) [41].



Рисунок 11 – Разделение производных 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона методом ВЭЖХ

Для решения задачи по идентификации побочных продуктов, образующихся в результате синтеза ДГИТ необходимо продумать анализ не только продуктов реакции, но и реагентов, поэтому следующий раздел посвящен количественным методам анализа тиомочевины как исходного реагента в синтезе ДГИТ.

1.5 Методы количественного анализа тиомочевины

В литературе представлено лишь несколько методов количественного анализа тиомочевины. В частности, титриметрические, спектроскопические, спектрофотометрические, электрохимические и хроматографические методы.

Титрование тиомочевины йодатом в кислой среде позволяет определять содержание тиомочевины в растворе до 1%. Подкисление тиомочевины (CS(NH₂)₂) приводит к образованию протонированной формы тиомочевины (HCS(NH₂)²⁺), которая реагирует с йодатом с образованием протонированного формамидиндисульфида ([CS(NH₂)₂]₂²⁺). Присутствие ионов – окислителей, таких как ионы меди или железа, могут окислять тиомочевину до формамидиндисульфида (FDS²⁺), снижая выщелачивающую способность раствора. Тогда в раствор перед титрованием добавляют цинковую пыль, она снижает FDS²⁺ за счет регенерации тиомочевины [42].

Спектроскопические методы определения тиомочевины. Авторы предлагают концентрацию тиомочевины в водных растворах определять методом КР-спектроскопии по полосе 735 см⁻¹, соответствующей -C=S группе, с использованием полосы карбоксильной группы при 880 см⁻¹ в качестве внутреннего стандарта. Метод позволяет определять тиомочевину в водных растворах в диапазоне определяемых концентраций от 5–20 г/л [43].

Авторами предложен определения метод тиомочевины с применением ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье, заключающийся в окислении тиомочевины йодом и регистрации спектров поглощения СО2 [44]. В стеклянный сосуд, содержащий 5 мл тиомочевины и 0,2 мл 1М раствора гидрокарбоната натрия, вводят 4 мл 1,4 масс.% раствора йода. Выделившийся в этих условиях СО₂ потоком азота помещали в инфракрасную газовую ячейку. Через 200 с после введения раствора йода непрерывно регистрировали ИК-спектры в газовой фазе во времени, в интервале от 2500 до 2200 см⁻¹, которые включают полосу поглощения CO₂ при 2350 см⁻¹. Метод позволяет определять тиомочевину с пределом обнаружения 10 м.д., относительное СКО для трех независимых анализов раствора тиомочевины с концентрацией 500 м.д составляет 1,1%.

Авторы [45] предложили метод анализа тиомочевины в подкисленном серной кислотой водном растворе в присутствии диоксида серы. Метод основан на частичной обработке ИКспектров в диапазоне 1350–1450 см⁻¹ методом наименьших квадратов данных. Метод применяется для определения концентрации тиомочевины при выщелачивании золота из руд в присутствии высокого содержания диоксида серы. Хроматографические методы определения тиомочевины. Недостаточная летучесть и стабильность тиомочевины не позволяет анализировать на прямую с помощью газовой хроматографии, для этого используют ВЭЖХ. Тиомочевину в диапазоне определяемых концентраций 100–5000 млрд⁻¹, анализируют с использованием ВЭЖХ с последующей массспектрометрией. Разделение тиомочевины от примесей проводят на хроматографе PerkinElmer Series 200 HPLC Systems на колонке Lichrospher 100-CN 4,6 мм, длиной 250 мм (Е. Merck, Дармштадт, Германия), с УФ-детектором Elmer LC-295, при длине волны 254 нм. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанола с водой (70:30, объемн.), скорость потока 1 мл/мин. Масс спектры регистрировали на тройном квадрупольном масс-спектрометре Perkin Elmer Sciex API III (Sciex Co., Торнхилл, Онтарио, Канада), оснащенном источником ионизации электроспреем (Sciex API) [46]. Градуировочная зависимость: (у = $-1027,264526 + 186,363907 \cdot X$) имеет линейный вид в области определяемых концентраций с коэффициентом корреляции R = 0,99992, показатель точности методики около 10%.

Электрохимические методы определения тиомочевины. Вольтамперометрическое определение тиомочевины включает один или два процесса электроокисления на твердых электродах в водной среде в зависимости от условий окисления, таких как материал электрода, pH раствора и приложенный потенциал [47]. Адсорбция и окисление тиомочевины на различных электродах проводят в кислой среде, так как в щелочных средах на электродах из благородных металлов адсорбция и окисление большинства соединений серы ограничено из-за потери электродной активности, вызванной накоплением адсорбатов серы и поверхностных оксидов [48]. Тем не менее платиновый электрод, модифицированный оксидом алюминия, использовался для определения тиомочевины в реальных образцах в диапазоне концентраций 1,9–228 мг/л [49]. Показана возможность использования графитированных электродов в диапазоне определяемых концентраций тиомочевины 1,0–30,0 мг/л в растворах электролитов медеплавильного производства [50].

Методом *анодной вольтамперометрии* [51] исследовано окисление тиомочевины на электродах, легированных бором, алмазом в кислой, нейтральной и щелочной средах. Экспериментальные результаты показали, что окисление тиомочевины проходит в две стадии. На первой стадии – медленный перенос электрона с образованием соответствующего свободного радикала и его димеризации, а на второй стадии – окисление (Рисунок 12).



Рисунок 12 – Схема реакции окисления тиомочевины

На основании анодного пика для первой стадии окисления в кислой среде был предложен вольтамперометрический метод определения тиомочевины в диапазоне 0,31–76,1 мг/л. Относительное СКО между определяемой концентрацией и заложенной около 2%.

Амперометрические определения тиомочевины были также успешно проведены на платиновых и золотых электродах, а также на медных электродах, таких как оксидно-медный электрод [52]. Напротив, ртутные электроды позволили использовать дифференциальную импульсную полярографию [53] и адсорбционную вольтамперометрию [54] для определения следовых количеств тиомочевины в моче с пределами обнаружения 1 мкг/л и 2,5 нг/л, соответственно.

Способность тиомочевины и ее производных образовывать нерастворимые комплексы с ртутью позволяет использовать катодную инверсионную вольтамперометрию на ртутном капельном электроде для их определения с пределом обнаружения до 1 нг/мл [55].

Спектрофотометрический способ определения следовых количеств тиомочевины (0,01–12,00 мг·л⁻¹) основан на ее каталитическом действии на окисление янусового зеленого йодатом калия в солянокислой среде. Реакцию контролировали, измеряя уменьшение поглощения красителя при 610 нм через 25 мин. Метод чувствительный, селективный и применяется для определения тиомочевины во фруктовых соках и апельсиновой цедре [56].

Авторы предложили спектрофотометрический метод определения тиомочевины основанный на ингибирующем влиянии тиомочевины на реакцию между метакрезоловым пурпурным и броматом калия, катализируемую ионами брома в сернокислой среде [57]. Тиомочевину можно определить в пределах 0,100–13,0 мкг/мл. Предел обнаружения (3 σ) для тиомочевины 0,0310 мкг/мл. Относительные стандартные отклонения для шести повторных определений 0,500, 5,00 и 12,0 мкг/мл тиомочевины составили 4,0%, 1,8% и 1,2% соответственно.

Предложенный метод также применялся для определения тиомочевины в образцах апельсинового сока и апельсиновой кожуры с извлечением в диапазоне 98,0–101,0%.

Предложен чувствительный колориметрический сенсор на основе азокрасителя эриохрома черного для обнаружения и определения тиомочевины. Хемосенсор показывает отчетливое изменение цвета от синего до розового при взаимодействии с тиомочевиной в водной среде. Линейный диапазон и предел обнаружения составляли соответственно 0,15–18,5 мкмоль/л и 0,02 мкмоль/л. Кроме того, относительное СКО на основе десяти повторений, рассчитанное для двух различных концентраций тиомочевины 4,4 и 9,0 мкмоль/л, составило 2,3% и 1,8% соответственно [58].

Почти все перечисленные выше методы обладают высокой чувствительностью и селективностью, однако из-за сложной матрицы в синтезе 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона они не подходят для определения тиомочевины в реакции с глиоксалем, поэтому разработка методик определения тиомочевины в реакции получения ДГИТ является актуальной. Также из литературного обзора видно, что анализ имдазолидин-2-тионов, ДГИТ и его производных представлен единичными примерами и ограничивается только идентификацией. Так как имидазолидин-2-тионы применяются в синтезе супрамолекулярных структур и различие в геометрии изомеров ДГИТ определяет ход их дальнейших превращений и упаковку в надмолекулярных соединениях, необходимо знать чистоту исходных ДГИТ и содержание в нем геометрических изомеров. В связи с вышесказанным, важно разработать методики определения и идентификации геометрических изомеров ДГИТ в смеси, а также определить побочные продукты в процессе его получения.

Кроме того, тиомочевина склонна к таутомеризации. Для минимизации образования побочных продуктов при синтезе ДГИТ, важным условием является ведение процесса с преобладанием тионной формы тиомочевины, поэтому актуальна задача исследования влияния условий синтеза ДГИТ на тион-тиольную таутомерию.

Глава 2. Общая характеристика объектов и методов исследования

2.1 Оборудование

В работе было использовано следующее оборудование:

- Спекторофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония);

– ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE 400 III HD (Brucker BioSpin GmbH, Германия);

– Видеоденситометр «Sorbfil-денситометр» (г. Краснодар, Россия);

– КР-спектрометр iHRSP320 (Horiba Scientific, Япония) с погружным зондом и длиной волны излучения 785 нм;

- Микрошприц Hamilton (10 мкл), США;

– Лабораторный рН-метр/иономер (Итан, Россия);

– Хроматографические пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ (5–8 мкм, 10×10 см) (г. Краснодар);

– Хроматографы: Agilent 1200 с термостатом (G1316A), четырехканальным градиентным насосом (G1311A) и диодно-матричным детектором (G1315D); Dionex Ultimate 3000 с автоматическим пробоотборником со встроенным термостатируемым отделением колонки (ACC-3000), четырехканальным насосом (DGP 3600RS) и детектором переменной длины волны (VWD 3400);

– Колонки: PerfectSil Target ODS-3 HD 250×4,6 мм, с размером частиц 5 мкм (MZ-Analysentechnik, Mainz, Германия); Zorbax Eclipse Plus C8 4,6×250 мм, с размером частиц 5 мкм (Agilent Technologies, CША;, Luna 5u PFP(2) 100 Å, 150×4,6 мм, с размером частиц 5 мкм (Phenomenex, CША); Zorbax RX-SIL Analytical 4,6×150 мм, с размером частиц 5 мкм, (Agilent Technologies, CША);Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, 5 мкм (Phenomenex, CША);

- Весы неавтоматического действия GR-200 (57514-14);

– Микровесы Sartorius CUBIS MSE 3,6Р-000-DM.

2. 2 Реагенты

Все используемые в работе реагенты аналитической чистоты.

Реагенты для ВЭЖХ, ТСХ, УФ-спектроскопии: вода, очищенная системой Milli-Q (Merck Millipore, США). Реактивы: метанол (99,9%), этанол (99,9%), пропанол-1, пропанол-2, тиомочевина (99+%), глиоксаль 40%-ый водный раствор, производства Acros Organics (США).

1,3-диметилтиомочевина 99,9% (Aldrich), гексан ч.д.а. (Вектон, Россия), сульфат меди ч.д.а. (Россия), *trans*-DHIT Acros Organics (99+%).

Ацетонитрил 95,0% для УФ, ИК, ВЭЖХ (Барселона, Испания); Кальций ацетат гидрат ч.д.а. (Россия), соляная кислота 35% (ЭКОС-1, Россия).

Растворители для ЯМР: ДМСО-*d*₆ с 99,8 атом. % D, D₂O с 99,8 атом. % D. (Сольвекс, Россия).

Пластины для TCX: Sorbfil ПТСХ-А-В-УФ (d = 5–8 мкм, алюминиевая подложка)

Синтез транс-ДГИТ

Суспензию тиомочевины (0,16 моль) в глиоксале (0,17 моль) перемешивали в течение 2 ч при 35°С. Твердый продукт бежевого цвета отфильтровывали, промывали большим количеством дистиллированной воды и сушили в вакуумном сушильном шкафу. Идентификацию проводили по ЯМР. Получали чистый *транс*-ДГИТ.

ЯМР 13С, δ, м.д:182,11 (C=S); 87,22 (CH). 1H, δ, м.д: 8,84 (с., NH); 4,71 (д., 2H, CH); 6,26 (д., 2H, OH).

Синтез смеси цис-и транс-ДГИТ

1,1 моль тиомочевины растворяли в 1 моль 40%-го раствора глиоксаля, предварительно10%-ым раствором Na₂CO₃ доведя pH раствора глиоксаля до значения 5. Смесь перемешивали при температуре 50 °C в течение 30 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, образовавшийся осадок фильтровали и получали смесь *цис-* и *транс-*ДГИТ. Идентификацию проводили по ЯМР.

ЯМР: ¹³С, δ, м.д: 181,35 (С=S); 79,95 (СН); 182,11 (С=S); 87,22 (СН).

¹H, δ, м.д.: 8,84 (с., NH); 8,66 (с., NH) 4,73 (д., 2H, CH); 5,04 (д., 2H, CH); 6,26 (д., 2H, OH); 5,81 (д., 2H, OH).

Синтез смеси цис- и транс-ДиМеДГИТ

1,2 моль диметилтиомочевины растворяли в 1 моль 40%-го раствора глиоксаля, предварительно 10%-ым раствором Na₂CO₃ доведя pH раствора глиоксаля до 5. Смесь перемешивали при температуре 50 °C втечение120 мин, охлаждали до комнатной температуры. Образовавшийся осадок отфильтровывали, сушили в вакуумном шкафу и получили смесь *цис*-и *транс*-ДиМеДГИТ.

ЯМР: смесь¹³С, б, м.д.: 181,00 (С=S); 87,67 (СН); 181,54 (С=S); 87,93 (СН); 30,80 (СН₃); 30,90 (СН₃).

¹H, δ, ppm: 2,98 (c, 6H, CH₃); 2,95 (c, 6H, CH₃); 4,73 (д., 2H, CH); 4.96 (д, 2H, CH); 6.58 (д, 2H, OH); 6.12 (д, 2H, OH).

2.3 Методы исследования объектов

Исследование тион-тиольной таутомерии тиомочевины с использованием УФ-спектроскопии. Регистрацию спектров тиомочевины в водно-спиртовых растворах проводили в диапазоне от 190 до 300 нм. Концентрация тиомочевины в растворе составляла 0,042 мг/мл в водно-спиртовых растворах с объемным соотношением вода:спирт (60:40). Кислую среду создавали, добавляя 35% раствор соляной кислоты до pH = 2. Спектры каждого раствора регистрировали по 3 раза, для оценки воспроизводимости в кварцевых кюветах с толщиной 1 см.

Исследование взаимодействия ДГИТ, тиомочевины, ДиМеДГИТ, ДиМеТМ с модифицированной ацетатом кальция пластиной. Для исследования взаимодействия ацетата кальция с растворами ДГИТ, тиомочевины, ДиМеДГИТ, ДиМеТМ регистрацию спектров проводили в диапазоне от 190 до 300 нм. Для этого использовали водные растворы этих аналитов и ацетата кальция с концентрацией 0,022 мг/мл Спектры каждого раствора регистрировали по 3 раза, для оценки воспроизводимости, в кварцевых кюветах с толщиной 1 см.

КР-спектроскопия тиомочевины. Регистрацию спектров проводили с помощью линзы, использовали водный и водно-спиртовые растворы тиомочевины с концентрацией тиомочевины 1 моль/л, и содержанием спирта в растворе 40 об.%. Мощность лазера: 1800 мА, время накопления спектра: 5 с, усреднение спектра: 3 спектра.

Методика определения тиомочевины в реакции образования ДГИТ с использованием КР-спектроскопии in situ. Эксперимент in situ проводили с использованием зонда, представляющего собой металлическую трубку с линзой из синтетического сапфира, который погружали в водный раствор тиомочевины с концентрацией 1 моль/л. Раствор термостатировали при температуре 35 °C, далее добавляли раствор глиоксаля с концентрацией 1 моль/л той же температуры, время добавления глиоксаля считали за начало реакции. Регистрацию спектров проводили через каждые 2 с, до тех пор, пока происходит изменение полосы тиокарбонильной группы тиомочевины при 730 см⁻¹. Концентрации тиомочевины рассчитывали по предварительно построенной градуировочной зависимости отношения КР-полосы тиомочевины при 730 см⁻¹и внутреннего стандарта – полосы зонда при 790 см⁻¹ от концентрации тиомочевины в растворе.

ЯМР-спектроскопия для подтверждения структуры соединений. Для идентификации соединений и подтверждения их структуры проводили регистрацию ¹Н и ¹³С спектров аналитов в ДМСО-*d*₆.

ЯМР-спектроскопия реакции взаимодействия тиомочевины с глиоксалем для идентификации побочных продуктов в реакции образования ДГИТ. Эксперимент по идентификации продуктов взаимодействия тиомочевины с глиоксалем осуществляли в 1 л реакторе (Syrris, Англия), оборудованном верхнеприводной мешалкой, термометром и обратным холодильником. Реакционную смесь переносили из реактора в количестве 400 мкл в ампулу для ЯМР, добавляли 200 мкл холодной D₂O и регистрировали ¹H и ¹³C спектры. По окончании реакции смесь концентрировали при 30 °C и остаточном давлении, затем записывали ¹H и ¹³C ЯМР спектры в ДМСО-*d*₆.

Методика разделения геометрических изомеров с применением TCX. Для разделения геометрических изомеров ДГИТ и ДиМеДГИТ, а также сопутствующих примесей – тиомочевины и N,N'-диметилтиомочевины были использованы пластинки для тонкослойной хроматографии Sorbfil ПТСХ-А-В-УФ (d=5–8 мкм, алюминиевая подложка) и пластины, модифицированные ацетатом кальция и сульфатом меди. Для приготовления подвижных фаз использовали гексан и изопропиловый спирт в разных соотношениях.

Пробы с концентрацией 0,01 г/мл в количестве от 0,1-1 мкл наносили на пластины микрошприцем на расстояние около 1 см от нижнего края пластины. Далее пластины опускали в хроматографическую камеру Camag, в которую предварительно внесли элюент в количестве 10 мл, так чтобы они были погружены не более чем на 0,5 см. Разделение изомеров проводили восходящим методом при комнатной температуре, движение фронта элюента составляло 6 см. Затем платины высушивали при комнатной температуре до полного удаления растворителя с пластины. Идентификацию веществ проводили в УФ-камере при длине волны 254 нм. Для обработки пластины и определения фактора удерживания аналитов (Rt) были сделаны снимки пластин в УФ-камере с использованием фотоаппарата с разрешением не менее 400 dpi. Затем полученные фотографии обрабатывали с помощью программы Sorbfil Videodensitometr TLC Quantitative Evaluation (г. Краснодар, Россия). Проводили не менее 3 параллельных экспериментов. Полученные соотношения изомеров в смеси сопоставляли с результатами ¹Н ЯМР.

Методика модифицирования ТСХ пластин. Для модификации хроматографических пластин использовали растворы солей ацетата кальция и сульфата меди. Модификацию проводили путем погружения пластин Sorbfil ПТСХ-А-В-УФ (d=5–8 мкм, алюминиевая подложка) в растворы ацетата кальция с концентрацией 0,1–2 масс.% на 1 час. До нанесения солей на поверхность пластин, пластины погружали в 0,1 М раствор соляной кислоты, затем промывали дистиллированной водой. После нанесения соли пластины промывали дистиллированной водой, затем сушили при 150 °C в течение 1 часа, промывали элюентом и снова сушили при тех же условиях.

ВЭЖХ методика разделения и определения геометрических изомеров ДГИТ и тиомочевины. Использовали колонку Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, размер частиц 5 мкм (Phenomenex, США); температура колонки 30 °C; скорость потока 1,5 мл/мин; объем инъекции составлял 2 мкл. Детекцию проводили при длине волны 245 нм; в качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил:вода (95:5, объемн.)

Эксперимент по определению кинетических параметров реакции взаимодействия тиомочевины с глиоксалем. Растворы тиомочевины и глиоксаля в воде с концентрацией 0,1 моль/л, смешивали при температуре 30 °C. Аликвоту реакционной смеси объемом 0,2 мл помещали в предварительно взвешенную пробирку с 0,8 мл ацетонитрила, охлажденного до 2–5 °C для остановки реакции, затем проводили ВЭЖХ-анализ. Далее флаконы взвешивали и определяли концентрацию тиомочевины и ДГИТ по площади хроматографического пика с учетом разбавления ацетонитрилом. Образцы перед анализом хранили в холодильнике при температуре 2–5°C. Первые 20 мин реакции отбор пробы проводили каждые 2 мин, далее с 5–10 минутным интервалом.

Глава 3. Обсуждение результатов

3.1 Исследование тион-тиольной таутомерии тиомочевины методом УФ-спектроскопии в водно-спиртовых растворах

Известно, что тиомочевина имеет плоское строение, молекула состоит из электроноакцепторной тионной группы -C=S и двух аминогрупп -NH₂, проявляющих электронодонорные свойства, поэтому для тиомочевины характерна тион-тиольная таутомерия и существование **13a** тионной (тиоамидной) и **136** тиольной (тиоимидной) форм (Рисунок 13), как было написано выше в литературном обзоре.



Рисунок 13 – Тион-тиольная изомерия тиомочевины

Методом УФ-спектроскопии нами были исследованы водно-спиртовые растворы тиомочевины. УФ-спектры раствора тиомочевины в воде имеют два максимума поглощения при 195 нм и 236 нм, как показано на рисунке 14.



Рисунок 14 – УФ-спектр тиомочевины в водном растворе

Поглощение при 195 нм обусловлено переносом заряда между двумя аминогруппами и соответствует $n-\pi^*$ переходу электронов аминогрупп (Рисунок 15) и относится к протонированной форме тиомочевины. Поглощение при 236 нм связано с π - π^* электронными переходами в тионной группе (C=S) [59]. Таким образом, первый и второй максимумы отвечают за присутствие тиольной 136 и тионной 13а формы соответственно.



Рисунок 15 – Резонансные структуры тиомочевины

Для определения содержания форм тиомочевины в растворах использовали соотношение оптической плотности при 236 и 200 нм (A₂₀₀/A₂₃₆) или (А_{тиол.}/А_{тион.}) с добавлением соляной кислоты и без нее (Таблица 1).

Таблица 1 – Максимумы поглощения тиомочевины в водных и водно-спиртовых растворах на УФ-спектрах

		А ₂₀₀ , без	А236, без	А ₂₀₀ , в	А236, В		
		добавления	добавления	присутствии	присутствии		
Растворитель	ε	соляной	соляной	соляной	соляной	Атиол./Атион.	А'тиол./А'тион.
		кислоты	кислоты	кислоты	кислоты		
		(Атиол.)	(Атион.)	(А' _{тиол.})	(А' _{тион.})		
вода	81	0,54	0,75	0,55	0,8	0,72	0,69
вода/метанол,							
60/40 об.%	33,1	0,58	0,72	0,57	0,83	0,81	0,69
вода/этанол,							
60/40 об.%	24,3	0,46	0,79	0,57	0,84	0,58	0,68
вода/пропанол-							
1, 60/40 об.%	21,8	0,38	0,92	0,57	0,79	0,41	0,72
вода/пропанол-							
2, 60/40 об.%	18,3	0,38	0,9	1,2	0,63	0,42	1,90

Спирты являются более слабыми кислотами по сравнению с водой из-за наличия алкильного заместителя, обладающего положительным индуктивным эффектом, что приводит к

увеличению электронной плотности на атоме кислорода и, следовательно, снижает полярность связи О–Н. Поэтому протонирование тиомочевины водой происходит легче, чем спиртом. Следовательно, в результате использования в качестве растворителя воды приводит к увеличению тиольной формы и уменьшению тионной формы, а в водно-спиртовых растворах наоборот происходит увеличение тионной и уменьшение тиольной формы (Таблица 1). Как известно, кислотность спиртов уменьшается от метанола к пропанолу, что согласуется с экспериментальными наблюдениями в виде увеличения количества тионной формы тиомочевины.





Сравнение полученных результатов со справочными данными по диэлектрической проницаемости растворителей (Рисунок 16) показывает, что при увеличении диэлектрической проницаемости растворителей без добавления кислоты количество тионной формы уменьшается, а при добавлении кислоты в этом же ряду растворителей – увеличивается, что не противоречит литературным данным [60]. Это экспериментальное наблюдение связано с уменьшением константы автопротолиза растворителя и более легким протонированием тиомочевины как более сильного основания в спиртах [61].

Таким образом, в данной части работы с применением УФ-спектроскопии установлено, что равновесие таутомеризации тиомочевины зависит от диэлектрической постоянной растворителя. Так как процесс получения ДГИТ ведут в слабокислой среде, то для преобладания тионной формы процесс необходимо вести в воде. Для дальнейшего исследования влияния растворителя на тиомочевину использовали КР-спектроскопию.

3.2 КР-спектроскопия тиомочевины, 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и глиоксаля

КР-спектроскопия тиомочевины в водно-спиртовых растворах

КР-спектр кристаллической тиомочевины включает в себя четыре сильные по интенсивности полосы в диапазоне частот от 400 до 1600 см⁻¹ (Рисунок 17).



Рисунок 17 – КР-спектр кристаллической тиомочевины

В частности, основные Рамановские полосы наблюдаются при 478, 734, 1095 и 1384 см⁻¹. Вышеперечисленные полосы, соответствующие частотам колебательных переходов для тиомочевины, относятся к деформационным колебаниям -N-C-N-, валентным колебаниям -C=S, валентным колебаниям -N-C-N-, деформационными колебаниями -NH₂ группы, и симметричным валентным колебаниям -N-C-N- соответственно. К тому же, малоинтенсивные полосы 577, 1611, 1637 см⁻¹, а также группа полос в области 3183–3373 см⁻¹ относятся к деформационным колебаниям -NH₂ группы [62, 63, 64, 65].

Спектр комбинационного рассеяния водного раствора тиомочевины согласуется со спектром твердой формы тиомочевины, но имеет незначительные изменения интенсивности и частоты некоторых полос (Рисунок 18). В частности, наблюдается смещение симметричных мод валентных колебаний -C=S и-N-C-N- связей до 730 и 1401 см⁻¹ соответственно. Авторы [66] связывают это наблюдение с сольватацией тиомочевины водой и образованием водородных связей. Причем теоретические расчеты, согласуются с практическими и показывают, что

молекула тиомочевины связана с одной молекулой воды через водородные связи -OH группы воды и -C=S и -NH₂ группы тиомочевины [67].



Рисунок 18 – КР-спектр водного раствора тиомочевины

Появление средней по интенсивности полосы в области 1636 см⁻¹ относят к сочетанию деформационных колебаний -NH₂ группы тиомочевины и колебаниям связей в воде. В области от 3000–3500 см⁻¹ наблюдается широкая полоса, относящаяся к деформационным колебаниям NH₂ и её взаимодействия с водой через водородные связи. Как правило, область 1200 см⁻¹, при малых концентрациях тиомочевины в растворе не информативна для идентификации, так как в этой области находятся полосы, относящиеся к КР-полосам матрицы – стекла.

Замена воды на водно-спиртовые растворы приводит к перекрыванию КР-полос тиомочевины в области от 1000 см⁻¹ до 3500 см⁻¹. КР-спектр тиомочевины в растворе метанола с концентрацией 60 масс.% представлен на Рисунке 19, для сравнения приведен спектр чистого метанола. КР-полосы тиомочевины, соответствующие валентным колебаниям -C=S и деформационным колебаниям -N-C-N- связей смещаются в более длинноволновую область, в сравнении с водным раствором тиомочевины и соответственно равны 740 см⁻¹ и 486 см⁻¹. Остальные КР-полосы тиомочевины не детектируются, так как перекрываются полосами метанола. Полоса при 1035 см⁻¹ вызвана валентными колебаниями -C–O- связи вне плоскости метанола. Спектральная область от 1400–2950 см⁻¹ соответствует несимметричным деформационным колебаниям -CH₃ группы, а также симметричным и несимметричным валентным колебаниям этой же группы. В области частот 2900–3000 см⁻¹, наблюдается резонанс

2980 см⁻¹и по интенсивности слабее полосы 2838 см⁻¹, относящейся к симметричным валентным колебаниям этой же группы. В области 1400–1600 см⁻¹наблюдается широкая полоса, которая относится к колебаниям -OH группы, а также деформационным колебаниям -CH₃. Две малоинтенсивные перекрывающиеся полосы в области 1100–1160 см⁻¹ относятся к плоскостным деформационным колебаниям -CH₃ группы спирта (маятниковое колебание) [68].



Рисунок 19 - КР-спектр тиомочевины в метаноле

На Рисунке 20 предоставлен КР-спектр тиомочевины в водно-этанольном растворе и КР-спектр водно-этанольного раствора. В водно-этанольном растворе тиомочевины детектируется мода 738 см⁻¹, относящаяся к валентным колебаниям -C=S связи и мода 490 см⁻¹, тиомочевины, отвечающая за деформационные колебания -N-C-N- группы, которая частично перекрывается модой 436 см⁻¹ этанола. Область спектра (Рисунок 20) от 800–3000 см⁻¹ относится к колебаниям связей в молекуле этанола. КР-полоса с максимальной интенсивностью при 884 см⁻¹ характеризует симметричные валентные колебания -C-C-O связи этанола, полоса 1052 см⁻¹ колебания -C-O связи, 1093см⁻¹ валентные колебания C-C-O. Сигнал при частоте 1278 см⁻¹ соответствует деформационным колебаниям -CH₂- группы в молекуле этанола. Деформационные колебания -CH₃ группы характеризует область 1457 см⁻¹. Спектральная область от 2884 см⁻¹ до 2977 см⁻¹ относится к валентным симметричным и несимметричным колебаниям -CH₃ и -CH₂-[69].



Рисунок 20 – КР-спектр тиомочевины в этаноле

С применением КР-спектроскопии тиомочевины в водном растворе пропанола-1 (Рисунок 21) детектируется только малоинтенсивная полоса 743 см⁻¹, относящаяся к группе - C=S тиомочевины и частично перекрывающаяся с сигналом при частоте 771 см⁻¹, характеризующая маятниковое колебание - CH₃ группы пропанола.



Рисунок 21 – КР-спектр тиомочевины в пропаноле-1

Полоса 466 см⁻¹ – ножничное колебание фрагмента -O-C(H₂)-C(H₂)-. Интенсивные полосы КР 860 см⁻¹ и 889 см⁻¹ характеризуют валентный колебания -C-C-C- и -OH групп, и полоса 889 см⁻¹, также относится к маятниковому колебанию -CH₃ группы. Полоса 971 см⁻¹ характеризует валентные колебания -C-O-, и деформационные колебания -OH группы. Сигнал на КР спектре при частоте 1059см⁻¹ относится к валентным колебаниям -C-C-C- и -C-O- связи. Область спектра с частотами от 1106 до 3000 см⁻¹ характеризует колебания -CH₃ и -CH₂ групп. Полосы комбинационного рассеяния 1106 см⁻¹, 1277 см⁻¹, 1300–1346 см⁻¹, 1455 см⁻¹, 2882 см⁻¹, 2915 см⁻¹ относятся к маятниковым колебаниям -CH₃, крутильным колебаниям -CH₂ группы, несимметричным, симметричным колебаниям -CH₃ и симметричным колебаниям метиленовой группы, соответственно.

В спектре комбинационного рассеяния тиомочевины в водном растворе пропанола-2, малоинтенсивная полоса 741 см⁻¹ соответствует валентным колебаниям -C=S группы тиомочевины (Рисунок 22). Сигналы при частотах 1305 см⁻¹ и 1131 см⁻¹ относятся к колебаниям - OH группы, также 1131 см⁻¹характеризует маятниковое колебание -CH₃ группы, остальные полосы соответствуют колебаниям -CH и CH₃ групп. Характерные сигналы КР спектра 434 –491 см⁻¹, 820 см⁻¹ и 1165 см⁻¹, 954 см⁻¹, 1134 см⁻¹, 1344 см⁻¹, 1456 см⁻¹, 2885 см⁻¹, 2923 см⁻¹, 2978 см⁻¹ – скелетные колебания, валентные колебания -C-C- связи, деформационные колебания -CH₃, веерное колебание -CH группы, несимметричные деформационные колебания -CH₃ группы, симметричные валентные колебания -CH₃, резонанс Ферми -CH₃ группы и несимметричные валентные колебания -CH₃ группы, соответственно.



Рисунок 22 – КР-спектр тиомочевины в пропаноле-2

Равновесие между таутомерными формами тиомочевины исследовали методом рамановской спектроскопии, так как тионная форма имеет характерную интенсивную полосу, соответствующую валентным колебаниям -C=S в области 730 см⁻¹ [7, 70]. Моду колебания -S-H, соответствующую тиольной форме тиомочевины, с малой интенсивностью в спектральной области 2800 см⁻¹ обнаружить трудно из-за ее перекрывания полосами растворителя. Сигнал с частотой при 481 см⁻¹, соответствующий валентным колебаниям фрагмента -C-N-C-, перекрывается сигналами пропилового и изопропилового спиртов. В связи с вышеизложенным рассматривалось влияние спиртов только на тионную форму тиомочевины.

Смена водного на водно-спиртовой растворитель приводит к смещению полосы комбинационного рассеяния -C=S тиомочевины в диапазоне Δ 14 см⁻¹ в длинноволновую область (Таблица 2). Максимальный сдвиг исследуемой полосы наблюдается в изопропиловом спирте, что может быть связано со стерическими эффектами и специфическим взаимодействием тиомочевины и изопропилового спирта. Кроме того, интенсивность полосы комбинационного рассеяния тионной группы уменьшается с уменьшением диэлектрической проницаемости растворителя. Это обстоятельство также указывает на экранирование этой группы за счет сольватации спиртами Рисунок 23 [71].

$$R \longrightarrow OH$$

$$S$$

$$H_2N \longrightarrow NH_2$$

$$R = -CH_{3,} -C_2H_{5,} -C_3H_7$$

Рисунок 23 – Предполагаемая схема сольватации тиомочевины спиртами

Экспериментальные данные, полученные методом КР-спектроскопии, хорошо согласуются с результатами УФ-спектроскопии.

	КР-полосы тиомочевины, положение полосы, см ⁻¹			
Аналит	Деформационные колебания	Валентные колебания		
	-N-C-N-	-C=S		
Тиомочевина	478	734		
Раствор тиомочевины в воде	479	729		

Таблица 2 – КР-полосы тиомочевины в водно-спиртовых растворителях

Продолжение таблицы 2

Раствор тиомочевины в метаноле	486	740
Раствор тиомочевины в этаноле	—	738
Раствор тиомочевины в пропаноле-1	_	743
Раствор тиомочевины в пропаноле-2	-	741

Резюмируя, с использованием УФ-спектроскопии показано, что количество тионной формы тиомочевины увеличивается в ряду вода> метанол> этанол> пропанол> изопропиловый спирт. В этом же ряду количество тиольной формы увеличивается при добавлении соляной кислоты за счет легкого протонирования тиомочевины. Показано, что с помощью КР-спектроскопии можно определить тионную форму тиомочевины по колебательной моде –C=S. В связи с тем, что КР-спектр тиомочевины имеет несколько интенсивных КР-полос, реакцию тиомочевины с глиоксалем исследовали с использованием КР-спектроскопии.

Идентификация продуктов взаимодействия тиомочевины с глиоксалем методом КР-спектроскопии in situ

Для определения продуктов взаимодействия глиоксаля с тиомочевиной был исследован КР-спектр глиоксаля (Рисунок 24), который в диапазоне 400–1300 см⁻¹ представляет собой область перекрывающихся полос, относящихся к валентным и деформационным колебаниям -С-С-, О-Н, -С-О-С-. Спектральная область 3000–3500 см⁻¹ характеризует моды гидроксильных и метиновых групп [72].



Рисунок 24 – КР-спектр 40%-го раствора глиоксаля
Некоторые различия полос в литературных источниках и экспериментальных данных обусловлено концентрацией глиоксаля в растворе и межмолекулярном взаимодействии характеристических групп с водой, также наличие димеров и тримеров глиоксаля в растворе усложняет расшифровку спектра (Рисунок 25). Отсутствие отдельных характеристических сигналов на КР-спектре не позволяет следить за его содержанием в анализируемом растворе, поэтому детальную расшифровку КР-спектра глиоксаля не проводили, рассмотрены только основные виды колебаний.



Рисунок 25 – Глиоксаль в водной среде: **а**-гемдиол, **б**-димер глиоксаля, **в**-тример дигидрат

Область КР-спектра 3200–3400 см⁻¹ относится к колебаниям -OH групп. Полоса 2955 см⁻¹ характеризует валентные колебания -CH групп глиоксаля. КР-полоса 1643 см⁻¹ относится к области колебания воды. Часть спектральной области 1400–1500 см⁻¹, с интенсивной полосой при 1356 см⁻¹ характеризует колебания -CH в мономере и димере глиоксаля гем-диола (Рисунок 25). Сигналы в области частот валентных колебаний при 1000 см⁻¹ обусловлены перекрыванием -C-O- и -C-OH групп. Часть спектра при длине волны 800–900 см⁻¹ относится к колебаниям -C-O- с, -C-C- фрагментов, а также циклическим структурам глиоксаля. Деформационные колебания -OH и -CH- связи глиоксаля находятся в области 600 см⁻¹ [72].

На спектре смеси тиомочевины с глиоксалем, хорошо видны характеристические колебательные моды тиомочевины, которые со временем пропадают, и появляются новые, что говорит о протекании химической реакции между тиомочевиной и глиоксалем (Рисунок 26). Интенсивность тиоамидной группы тиомочевины уменьшается, появляется интенсивная полоса комбинационного рассеяния при 920 см⁻¹, которая относится к -C=S группе 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона (ДГИТ).

Вторая по интенсивности полоса 489 см⁻¹, а также полосы 434 см⁻¹ и 1208 см⁻¹ характеризуют деформационные колебания -N-C-N- цикла ДГИТ. Сигнал при частоте 1208 см⁻¹ также относится к области перекрывающихся полос деформационных колебаний -CH- и OH-группы. Полоса 1072 см⁻¹ характеризует валентные колебания -C-C-O-,также в этой области

находятся деформационные колебания -OH группы ДГИТ, эта же группа имеет рассеяние в области 800°см⁻¹. С Сигнал 1529 см⁻¹ относится к деформационным колебаниям -NH кольца ДГИТ. КР-полоса в области 1600 см⁻¹ относится к колебаниям связей в воде, а также деформационным колебаниям аминогруппы.



Рисунок 26 – КР-спектр реакции тиомочевины с глиоксалем в начальный момент времени (t=0° мин), в конце реакции (t=143 мин)



Рисунок 27 – Изменение интенсивности КР-полос реакции взаимодействия тиомочевины с глиоксалем во времени

С целью выбора КР-полосы для контроля реакции между тиомочевиной и глиоксалем был построен график в координатах интенсивность изменяющихся КР-полос от времени (Рисунок 27). Наибольшее изменение интенсивности полос, между начальным и конечным состоянием имеют валентные колебания моды 730 см⁻¹, характеризующей -C=S исходной тиомочевины, и моды колебания -C=S в ДГИТ при частоте 920 см⁻¹. Если принять во внимание тот факт, что в реакционной массе кроме ДГИТ ничего больше не образуется, то концентрацию ДГИТ и тиомочевины можно определить, взяв за 100%-исходную концентрацию тиомочевины.

Таким образом резюмируя полученные экспериментальные данные, с использованием КР-спектроскопии можно качественно контролировать расходование тиомочевины и образование ДГИТ по изменению интенсивности сигналов валентных колебаний -C=S групп тиомочевины и ДГИТ. Следующим этапом работы являлся переход качественной методики идентификации тиомочевины в количественную методику определения тиомочевины методом КР-спектроскопии в реакции получения ДГИТ.

Разработка методики определения тиомочевины в реакции образования 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с использованием КР-спектроскопии in situ

Для разработки методики определения тиомочевины в реакционной массе с использованием КР-спектроскопии *in situ*, необходимо, чтобы интенсивность КР-полосы тиомочевины зависела только от концентрации. Однако, интенсивность КР-полосы зависит не только от концентрации аналита, но и от фокусного расстояния, от мощности источника (лазера), от поглощения среды, частоты рассеянного света, отклика спектрометра [73]. Поэтому для нивелирования влияния фокусного расстояния на интенсивность КР-полосы регистрацию спектров проводили с использованием щупа (зонда), который погружали в исследуемый раствор. Зонд представляет собой металлическую трубку из сплава и сферической линзы, изготовленной из синтетического сапфира (Рисунок 28).

Зонд имеет свой КР-спектр [74], который включает в себя несколько интенсивных полос в области 700 см⁻¹ и 1000–1400 см⁻¹, что соответствует колебаниям фосфатов, оксидов алюминия, цинка, лантана а также колебаниям связей -Si-O- (Рисунок 29) [75]. Еще одним преимуществом использования зонда является отсутствие необходимости отбора пробы, так как съемка происходит в режиме *in situ*, поэтому можно исследовать реакции в проточных и статических системах, а также на анализ не влияет дифференциальное светорассеяние (распределение твердых частиц).



Рисунок 28 – Фото зонда для КР-спектроскопии

Рисунок 29 – КР-спектр зонда

Для того, чтобы все остальные параметры (мощность источника, частота рассеянного света, отклик спектрометра), от которых зависит интенсивность КР-полосы были постоянными, в литературе предлагают использовать внутренний стандарт. Внутренним стандартом обычно является КР-полоса, интенсивность которой постоянна во времени. Мы в качестве внутреннего стандарта использовали полосу щупа при частоте 790 см⁻¹, считая, что ее интенсивность не меняется во время реакции, так как относительное СКО изменения этой полосы во времени составляет 0,7% (Рисунок 30, 31). Такой подход приведен в литературе для щупа с алмазной линзой [76, 77]. Для определения концентрации тиомочевины в растворе строили градуировочную зависимость отношения интенсивностей сигнала аналита к полосе «стандарта» от концентрации определяемого компонента. Далее концентрацию тиомочевины определяли по градуировочной зависимости, подставляя значения отношения интенсивности КР-полос в уравнение прямой. Использование полосы зонда при 790 см⁻¹ приводит к линейной зависимости интенсивного рассеяния и концентрации тиомочевины [78].

Были оценены метрологические характеристики методики определения тиомочевины в реакции образования ДГИТ по показателям: линейность, правильность, промежуточная прецизионность, повторяемость и точность.







При разработке методики определения ДГИТ в реакционной массе методом КР-спектроскопии *in situ* столкнулись с трудностями. Градуировочная зависимость концентрации ДГИТ от отношения интенсивности сигнала аналита при частоте 920 см⁻¹ к стандарту при 790 см⁻¹ имеет линейный вид с уравнением: $y = 0,4173 \cdot X + 0,1141$ и R² = 0,949. Однако узкий диапазон определяемых концентраций от 0,11 до 0,18 моль/л, не позволяет количественно определять концентрацию ДГИТ в реакции. Минимальная концентрация ДГИТ обусловлена наложением КР-полосы ДГИТ с полосой стандарта, а максимальная связана с ограниченной растворимостью ДГИТ в воде.

Метрологические характеристики методики определения тиомочевины в реакции образования 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с использованием КР-спектроскопии in situ

Оценка метрологических характеристик методики определения тиомочевины в синтезе ДГИТ *in situ* проводилась по РМГ 61 2010 (P=0,95, n=5, l=3) по показателям: линейность, правильность, промежуточная прецизионность, повторяемость и точность [79]. Подробный расчет представлен в Приложении А.

41

Таблица 3 – Приготовление растворов тиомочевины для построения градуировочной зависимости отношения интенсивностей полосы аналита (730 см⁻¹) к стандарту (790 см⁻¹) от концентрации тиомочевины и результаты регистрации КР-спектров

С	т навески				
тиомочевины,	тиомочевины,	V колбы,		I (790),	
моль/л	МΓ	МЛ	I (730), см ⁻¹	см ⁻¹	I (730/790)
0	_	_	6271,97	9314,71	0,67
0,10	790,0	100	6479,28	9206,24	0,70
0,20	1523,1	100	6963,49	9306,4	0,75
0,30	1146,5	50	7281,97	9330,12	0,78
0,49	1911,2	50	7978,51	9494,14	0,84
0,79	3077,4	50	9252,42	9421,93	0,98
1,08	4197,1	50	10497,20	9576,58	1,10
1,40	5421,8	50	12038,90	9741,0	1,24
1,57	3048,8	25	12585,60	9624,99	1,31

Для определения линейности методики строили градировочную зависимость отношения интенсивностей полосы аналита при частоте 730 см⁻¹ к стандарту при частоте 790 см⁻¹ от концентрации тиомочевины. Для этого готовили растворы тиомочевины в диапазоне от 0,10 до 1,57 моль/л методом навесок (Таблица 3) и регистрировали КР-спектры с использованием зонда. Затем строили градуировочную зависимость I (730/790) от С тиомочевины (Рисунок 32).



Рисунок 32 – Градуировочная зависимость I (730/790) от Стм, в диапазоне концентраций от 0,10 до 1,57 моль/л

Построенная градуировочная зависимость имеет линейный вид в диапазоне определяемых концентраций от 0,10 до 1,57 моль/л, и описывается уравнением: y = 0,4067x + 0,6616, $R^2 = 0,998$.

Показатель повторяемости методики оценивали как СКО в условиях повторяемости, относительное СКО повторяемости методики в диапазоне определяемых концентраций не превышает 4,9 %. Показатель промежуточной прецизионности оценивали как СКО в условиях прецизионности, относительное СКО прецизионности методики в диапазоне определяемых концентраций не превышает 4,3 %. Показатель правильности и точности методики оценивали как расширенную неопределенность, с максимальным значением относительной расширенной неопределенности 11,5 % и 12,6 % (Таблица 4). Кроме того, по t-критерию оценена систематическая погрешность методики, установлено, что в диапазоне от 0,2 до 1,57 моль/л она не значима на фоне случайного разброса. При концентрации тиомочевины 0,1 моль/л, погрешность значима, поэтому учтена при расчете расширенной неопределенности.

С	Показатель		Показатель		Показатель		Показатель		
тиомочевины,	повторяе	мости	промежуточной		правильн	правильности		точности	
моль/л			прецизионности						
	σ _{r,л} ,	σ _{г,л} , %	σ _{R, л} , моль/л	σ к, л, %	U ₀ , моль/л	Uθ, %	Um, моль/л	Um, %	
	моль/л								
0,10	0,01	4,9	0,005	4,3	0,012	11,5	0,013	12,6	
0,20	0,01	4,0	0,008	3,7	0,004	2,2	0,01	4,4	
0,30	0,01	3,0	0,009	3,3	0,008	2,6	0,02	5,1	
0,49	0,01	1,9	0,014	2,9	0,014	2,9	0,03	5,7	
0,79	0,01	1,3	0,020	2,6	0,022	2,8	0,04	5,5	
1,08	0,01	1,0	0,026	2,3	0,029	2,6	0,06	5,2	
1,40	0,02	1,3	0,048	3,4	0,054	3,7	0,11	7,6	
1,57	0,03	1,6	0,062	3,7	0,067	4,1	0,13	8,5	

Таблица 4 – Метрологические характеристики методики определения тиомочевины в реакционной смеси методом КР-спектроскопии *in situ*

Методика определения тиомочевины с использованием КР-спектроскопии *in situ* линейна и прецизионна в диапазоне определяемых концентраций 0,10 до 1,57 моль/л. Основные стадии методики включают в себя регистрацию КР-спектров стандартных растворов тиомочевины для построения градуировочной зависимости, далее построение градуировочной функции

43

С_{тм} =f(I_{730/790}). Затем проводят регистрацию КР-спектров *in situ* реакции взаимодействия тиомочевины с глиоксалем. Далее без обработки КР-спектров по градуировке определяют концентрацию тиомочевины (Рисунок 33).



Рисунок 33 – Основные этапы методики определения тиомочевины в реакции образования ДГИТ методом КР-спектроскопии *in situ*

После регистрации КР-спектров реакции тиомочевины с глиоксалем по изменению интенсивности полос комбинационного рассеяния тиомочевины и ДГИТ, можно отметить, что кривая образования ДГИТ уже вышла на плато, а тиомочевина продолжает расходоваться, что говорит о протекании побочных реакций (Рисунок 27). Для определения пути расходования тиомочевины и образования побочных продуктов, которые не удалось идентифицировать КР-спектроскопией по причине близости КР-сдвигов для групп атомов близких по структуре, реакция взаимодействия глиоксаля с тиомочевиной исследовалась с помощью ЯМР-спектроскопии, результаты которой представлены в следующем разделе.

3.3 Идентификация продуктов взаимодействия тиомочевины с глиоксалем методом ЯМР-спектроскопии

При изучении реакции взаимодействия тиомочевины с глиоксалем во времени на ¹Н спектре (Рисунок 34), интенсивность сигнала 7,0 м.д. амидных протонов тиомочевины

уменьшается, появляются сигналы в области слабого поля – 8,0–9,0 м.д., которые относятся к амидным протонам *цис-, транс-*ДГИТ и сигнал в области 11,0 м.д., который может относится как к амино-, так и гидроксильной группе неидентифицированного соединения. Со временем также происходит изменение сигналов глиоксаля в области сильного поля – 5,5–4,8 м.д., а также увеличивается интенсивность сигнала 3,5 м.д., присутствующего в самом начале синтеза, предположительно относящегося к водороду метиленовой группы.



Рисунок 34 – ¹Н ЯМР-спектр реакции тиомочевины с глиоксалем во времени, растворитель H₂O+D₂O

На спектре ¹³С (Рисунок 35) также видно изменение сигналов в области 181,0–183,0 м.д., которое связано с уменьшением концентрации тиомочевины и образованием *цис-* и *транс-*ДГИТ, кроме того, появлением сигналов в области 160,0–115,0 м.д, четвертичных атомов углерода еще неидентифицированных веществ. Изменение в области 79–105 м.д. соответствует уменьшению концентрации глиоксаля и образованию ДГИТ. Область химических сдвигов от 62 до 60 м.д. соответствует метиновым или метиленовым группам.



Рисунок 35 – ¹³С ЯМР-спектры реакции тиомочевины с глиоксалем во времени, растворитель H₂O+D₂O

С использованием DEPT 135 (Рисунок 36) (который позволяет выделить различные типы замещения атомов углерода) установили, что сигналы от 183–154 м.д. относятся к четвертичным атомам углерода. Сигналы, направленные в одну сторону с метиновыми атомами углерода ДГИТ в области спектра от 86 до 83 м.д., относятся к метиновой группе, а направленный вниз сигнал 62,6 м.д. – метиленовая группа.

Для определения соответствия между атомами H–C была проведена регистрация 2D спектров ¹³C–¹H HSQC и ¹³C–¹H HMBC. Спектр ЯМР ¹³C–¹H HSQC показывает прямые корреляции между атомами C–H, а спектр ¹³C–¹H HMBC (Рисунок 37), характеризующий дальние взаимодействия углеродных атомов с протонами, позволяет установить последовательность связывания углеродных атомов в молекуле (Таблица 5). Сигналы метиновой группы *цис*-ДГИТ с прямой ¹³C–¹H (79,90–5,04 м.д.) и дальней (79,90–8,60м.д.) корреляциями, также *транс*-ДГИТ с прямой (87,21–4,73 м.д.) и двумя дальними корреляциями (87,21–6,29 м.д.; 182,1–8,86 м.д.) [80].



Рисунок 36 – Спектр ЯМР ¹³С DEPT 135 реакционной смеси синтеза 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, растворитель ДМСО-d₆



Рисунок 37 – ¹³С–¹Н HSQC ЯМР-спектр реакционной смеси синтеза 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, растворитель ДМСО-d₆

Дальнейшая расшифровка ЯМР спектров реакционной массы позволяет сделать вывод о том, что протон 7,12 м.д. с дальней корреляцией с углеродом метиновой группы 84,17 м.д., с прямой корреляцией ¹³C–¹H (84,17–4,58 м.д.), относится к -NH-группе (Таблица°5).

Т	аблица	5 – F	езультаты	2D	ЯМР-спектро	з ¹³ С- ¹ Н	HSQC и	$^{13}\mathrm{C}\text{-}^{1}\mathrm{H}$	HMBC	целевых	И
побочнь	ах проду	ктов ј	реакции ти	омоч	невины с глиок	салем					

Прям	иые			Дал	ьние	
коррел	яции			корре	еляции	
¹ H- ¹³ C	NMR	Мультиплетность	Фрагмент	¹ H- ¹³	C NMR	Фрагмент
¹³ C	¹ H			¹ H	¹³ C	
63,09	3,38	синглет	CH2	_	_	_
77,49	4,92	дублет	-CH-		_	_
			<i>цис-</i> ДГИ	_		
79,95	5,04	дублет	-CH-	8,67	79,90	<u>-C</u> H-CH-N <u>H-</u>
			<i>цис-</i> ДГИТ			
84,17	4,58	дублет	-CH-	7,12	84,17	
			транс-ДГИ			<u>-С</u> н-Сн-№ <u>н-</u>
87,22	4,73	дублет	CH	6,29	87,21	- <u>С</u> Н-О <u>Н</u>
			транс-	8.86	182.1	-CH-CH-NH-
			ДГИТ	0,00	102,1	
116,09	6,81	синглет	-C=C-	6,81	160,63	<u>-C</u> H-CH-N <u>H-</u>

Из приведённых данных видно, что амидные и метиновые протоны, а также углерод метиновой группы смещены в сторону более сильного поля, в сравнении с сигналами *транс*-ДГИТ, что обусловлено их экранированием более электроотрицательным элементом, чем сера, например кислородом амидной группы с сигналом в области 160 м.д. на спектре 13 C. Наличие в протонном спектре дублетов метиновой группы, а также исходя из интенсивности сигналов протонов NH:CH=1,53:1,53, позволяет сделать вывод, что сигнал на ¹Н спектре в виде дублета 5,9 м.д. с интегральной интенсивностью 1,53, принадлежит гидроксильной группе (Рисунок 38). Совокупность вышеприведенных данных позволяет идентифицировать соединение *транс*-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-он (ДГИ) под номером V на рисунках 38 и 39. Кроме того, углерод другой метиновой группы 77,49 м.д. имеет прямую корреляцию с протоном в области 4,92 м.д. (Таблица 5), а сигналы протонов 6,95 м.д. и 5,5 м.д., не имеющие прямой корреляции с углеродом, с одинаковым значением интегральной интенсивности с протоном метиновой группы

в области 4,92 м.д., относятся к амидным и гидроксильным протонами, соответственно. Небольшое смещение описанных сигналов в область сильного поля относительно соответствующих сигналов в *mpaнc*-ДГИ позволяет сделать вывод, что соединение под номером **IV** на рисунках 38, 39 – *цис*-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-он (*цис*-ДГИ) [81]. На спектре ¹³С реакционной массы присутствуют 3 сигнала карбонильного атома углерода и 2 из них не имеют корреляцию (сигналы 161,08 м.д. и 160.29 м.д.) (Рисунок 39). Сигнал, более сильном поле 160,29 м.д. относится к карбонильной группе *цис*-ДГИ, а 161,08 м.д. соответствует карбонильной группе *транс*-ДГИ. Идентифицированные сигналы не противоречат литературным данным [82, 83].



Рисунок 38 – ¹Н ЯМР-спектр реакционной смеси синтеза 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, растворитель ДМСО-*d*₆

Оставшийся неидентифицированный сигнал четвертичного атома углерода 160,63 м.д. имеет дальнюю $^{13}C^{-1}H$ корреляцию с протоном 6,81 м.д., который имеет прямую корреляцию с метиновой группой в области 116 м.д. Протон метиновой группы в этой области спектра относится к соединениям с двойной связью. Магнитный анизотропный эффект двойной связи, приводит к дезэкранированию метиновой группы до 116 м.д. и её смещению в слабое поле в сравнении с *транс*-ДГИТ, дезэкранированию протонов -NH группы и смещению в слабое поле со значением 11,91 м.д., а также к экранированию тиоамидной группы со значением 160,63 м.д. (Рисунок 38, 39). Согласно интегральным интенсивностям NH:CH относятся как 2:2, то есть

количество амидных и метильных протонов эквивалентно, что позволяет предположить структуру идентифицируемого вещества – 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тион под номером III на рисунке 38, 39 [84].



Рисунок 39 – ¹³С ЯМР-спектр реакционной смеси синтеза 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, растворитель ДМСО-*d*₆

При динамическом ЯМР анализе интенсивность сигнала метильной группы при 63,09 м.д. с прямой корреляцией протона в области 3,37 м.д. не изменялась, что позволило отнести этот сигнал к метиленовой группе гликолевой кислоты, которая входила в качестве примеси в глиоксаль. Ранее неидентифицированный сигнал в области 183,91 м.д. (Рисунок 39) относится к карбонильной группе этой кислоты [85].

Кроме этого, при динамическом ЯМР-анализе и регистрации спектров в смеси растворителей H₂O/D₂O, на спектре ¹³C сигналы соединений I, II, III, IV, V выглядят в виде «дублетов», причем разница между химическими сдвигами соседних сигналов составляет 0,06–0,14 м.д. (Рисунок 40). Для установления причины данного явления был снят спектр ДГИТ фирмы «Aldrich» в DMSO-*d*₆, D₂O и H₂O/D₂O. В растворителе H₂O/D₂O также наблюдается «удвоение» сигналов в спектре ¹³C. Мы предполагаем, что это связно с дейтерообменом амидных и гидроксильных протонов (Рисунок 41). Середина «дублета» в ¹³C смещена относительно синглета в сильное поле, это происходит за счет замены легкого изотопа – водорода на более тяжелый – дейтерий, что приводит к увеличению экранирования.



Рисунок 40 – ¹³С ЯМР-спектр реакционной смеси синтеза 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, растворитель H₂O/D₂O



Рисунок 41 – Схема дейтерообмена для 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-она (тиона) в системе H₂O/D₂O

Авторы [86] разницу между значениями химических сдвигов в спектре ¹³С в присутствии оксида дейтерия по сравнению с водой, называют изотопные сдвиги дейтерия или индуцированные дейтерием изотопные сдвиги¹³С (ДИС): ДИС = δ (H₂O)- δ (D₂O).

Величина ДИС в ЯМР ¹³С зависит от соседних групп, в состав которых входят протоны, способные замещаться дейтерием, а также от температуры. Таким образом, это значение позволяет определить, какая группа связана с углеродом в данной молекуле. В ДГИТ протоны, которые могут быть замещены дейтерием, связаны с гетероатомами кислорода (-OH) и азота (-NH-). В смешанном растворителе (H₂O/D₂O) форма сигналов -C-OH(D) и -C-NH(D) сильно

зависит от скорости обмена H/D. Обычно амидный обмен C-NH(D) протекает медленно, однако гидроксильный обмен -C-OH(D) происходит быстро и сигналы выглядят как «синглетные». В нашем эксперименте реакционную смесь разбавляли холодной D₂O, а затем регистрировали спектры ЯМР. Таким образом, ЯМР-анализ образца проводился при температуре около 10 °C, и наблюдались амидный C-NH(D) и гидроксильный C-OH(D) обмены.

Стоит обратить внимание на значения ДИС для четвертичных атомов углерода геометрических изомеров ДГИТ, которые составляют 0,08 и 0,06, м.д., это же значение имеют *цис-* и *транс* – ДГИ, что можно отнести к фрагменту С-(NH(D))₂-) (Таблица 6). Фрагмент молекулы ((D)HO-C-) ДГИТ и ДГИ имеет значение 0,12 и 0,11 м.д. Максимальное значение ДИС принадлежит фрагменту (-(D)HN-C=) в молекуле 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тиона, в которой реализуется дейтерообмен только амидных протонов. Единственный сигнал 62,58 м.д. на спектре ¹³С в виде синглета. Так как дейтерообмен в данных условиях не происходит, возможно его скорость велика, и при регистрации спектра этот эффект не наблюдается, поэтому можно предположить, что атом углерода связан только с водородом, или с сильной электроноакцепторной группой, такой как карбоксильная. Данное наблюдение подтверждает вышеизложенное предположение, что сигнал 62,58 м.д. соответствует метильной группе гликолевой кислоте.

¹³ C,	м.д.	ДИС, м.д.	Фрагмент	13C,	м.д.	ДИС, м.д.	Фрагмент
181,76	181,67	0,08	-(D)HN-C-	86,41	86,29	0,12	(D)HO-C-
180,68	180,63	0,06	-(D)HN-C-	83,46	83,35	0,11	(D)HO-C-
162,56	162,50	0,06	-(D)HN-C-	79,77	79,66	0,11	(D)HO-C-
116,81	116,67	0,14	-(D)HN-C=	77,35	77,25	0,10	(D)HO-C-
				62,58			

Таблица 6 – Значения изотопных сдвигов дейтерия (ДИС) ¹³С ядер в системе H₂O/D₂O

При рассмотрении ближайшего аналога ДГИТ – *N*,*N*'-диметилДГИТ на наличие дейтерообмена гидроксильных протонов, на спектре ¹³С в смеси H₂O/D₂O отсутствуют дублеты, что может быть связано с индуктивным эффектом метильных групп (Рисунок 42).

Таким образом, с использованием ЯМР-спектроскопии установили, что продуктами взаимодействия тиомочевины с глиоксалем являются: *цис*-ДГИТ (I), *транс*-ДГИТ (II), 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тион (III), *цис*-ДГИ (IV), *транс*-ДГИ (V) (Рисунок 38, 39). Показано, что с использованием значения ДИС можно дополнительно определять структуры имидазолидин-2-тионов, 2-онов и имидазолидинов.



Рисунок 42 – ¹³С ЯМР спектр *N*,*N*'-диметилДГИТ

В ходе проведенных исследований определили, что основным продуктом реакции тиомочевины с глиоксалем является смесь геометрических изомеров, количественный анализ и разделение которых не проводилось. Поэтому следующий раздел посвящен разделению и определению геометрических изомеров ДГИТ в рацемической смеси с использованием жидкостной хроматографии.

3.4 Методы жидкостной хроматографии для определения тиомочевины и геометрических изомеров 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона

Выбор оптимальных условий разделения геометрических изомеров 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и N,N'-диметил-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с использованием тонкослойной хроматографии

Как правило, для эффективного разделения анализируемых веществ необходимо подобрать такие условия хроматографирования, чтобы вещества удерживались с 0,2≤R ≤ 0,9. В качестве неподвижной фазы использовали пластинку с силикагелем марки Sorbfil ПТСХ-АФ-В-

УФ, в качестве подвижной фазы использовали смесь изопропилового спирта с гексаном. Зависимость количества гексана в % в подвижной фазе от R_f представлена на рисунке 43.



Рисунок 43 – Зависимость фактора удерживания ТМ и геометрических изомеров ДГИТ от количества гексана в подвижной фазе

На поверхности пластины с силикагелем находятся высокополярные гидроксильные группы. Поэтому полярные функциональные группы аналита сильно взаимодействуют с этой поверхностью, а неполярные группы – слабо. Таким образом, фактор удерживания аналита пропорционален количеству в нем полярных групп, поэтому сначала элюируется *транс*-изомер ДГИТ, так как наличие двух полярных гидроксильных групп в *транс*- положении относительно плоскости гетероцикла приводит к адсорбционному взаимодействию с неподвижной фазой только одной группы из-за стерических затруднений. В состав тиомочевины входят две полярные аминогруппы, а у цис-ДГИТ две полярные гидроксильные группы. Как описано выше, тиомочевина склонна к тион-тиольной таутомерии и с понижением диэлектрической проницаемости среды легче протонируется, таким образом количество тиольной формы увеличивается, поэтому при разделении адсорбционное взаимодействие силикагеля происходит с одной амино- и тиольной группой тиомочевины (Рисунок 44) [87]. Однако сила межмолекулярного взаимодействия между тиольной группой и гидроксильной группой силикагеля меньше, чем гидроксильной группой цис-ДГИТ [88]. Как следствие, наибольшее удерживание проявляет цис-изомер, так как две гидроксильные группы, расположенные по одну сторону от плоскости гетероцикла, более эффективно взаимодействуют с неподвижной фазой, а промежуточное место занимает тиомочевина.



Рисунок 44 – Предполагаемое взаимодействие аналитов с неподвижной фазой при разделении смеси ДГИТ и тиомочевины методом TCX на пластине Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ

Наибольшее разрешение между изомерами достигается путем использования элюента, содержащего 50% гексана и 50 % изопропилового спирта, при этом ухудшается разрешение между тиомочевиной и *транс-* ДГИТ. В найденных условиях, оптимальное разрешение между аналитами достигается путем использования 40 % гексана и 60 % изопропилового спирта.

Как показали экспериментальные данные, разделение в этой же системе *N,N'*-диметилзамещенных тиомочевины, *цис-* и *транс-*ДГИТ происходит с некоторыми отличиями от смеси с незамещенными тиомочевиной и ДГИТ. *N,N'*-диметилтиомочевина имеет наибольшее удерживание, из-за меньшей склонности к таутомерии, в сравнении с незамещенной тиомочевиной, и взаимодействия двух амино- групп с поверхностью силикагеля. Далее удерживается *цис*-ДГИТ с двумя гидроксильными группами, и *транс*-ДГИТ с одной доступной гидроксильной группой (Рисунок 45).



Рисунок 45 – Предполагаемое взаимодействие аналитов с неподвижной фазой при разделении смеси ДиМеДГИТ и ДиМеТМ методом TCX на пластине Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ

Максимальное разрешение между веществами достигается путем использования смеси гексана с изопропиловым спиртом в объемном отношении 50:50 (Рисунок 46).



Рисунок– 46 Зависимость фактора удерживания ДиМеТМ, *цис-* и *транс-* ДиМеДГИТ от количества гексана в подвижной фазе

Так как ДГИТ является диолом, известно, что качественной реакцией на многоатомные спирты является взаимодействие со свежеприготовленным раствором гидроксидом меди (II), поэтому для более специфичного разделения геометрических изомеров ДГИТ пластину модифицировали сульфатом меди. На пластине модифицированной 1% раствором сульфата меди на старте остаются ТМ, ДГИТ, ДиМеТМ, кроме ДиМеДГИТ с Rf~0,9. При уменьшении концентрации сульфата меди до 0,1% в неподвижной фазе, снизилось удерживание тиомочевины, ДГИТ и ДиМеТМ, вещества сдвинулись со старта, однако адсорбционное взаимодействие меди с этими веществами достаточно велико, что приводит к размыванию пятен на пластине, Rf ДиМеДГИТ при этом не меняется. Эти экспериментальные факты указывают на то, что больший вклад в удерживание анализируемых веществ на пластине, модифицированной медью, вносит тиоамидная группа, образуя с медью комплекс, а не гидроксильные группы геометрических изомеров. Причем удерживание незамещенной тиомочевины больше чем замещенной, а удерживание незамещенного ДГИТ больше чем замещенного (Рисунок 47).



Рисунок 47 – Разделение аналитов на пластине, модифицированной: а-раствором 0,1 % CuSO₄, **б**-раствором 1% CuSO₄

В ВЭЖХ для разделения сахаров используют колонки, в состав которых входит кальций, поэтому для более специфичного разделения геометрических изомеров неподвижную фазу модифицировали ацетатом кальция [89]. Ацетат кальция может адсорбироваться на поверхности пластины за счёт донорно-акцепторных взаимодействий между кальцием и силанольными группами. Также ацетат кальция при нагревании может вступать с силанольными группами в реакцию с образованием воды и уксусной кислоты (Рисунок 48).

При ДГИТ анализе смеси незамещенных тиомочевины И на пластинах, модифицированных ацетатом кальция показано, что увеличение концентрации ацетата кальция в неподвижной фазе до 2 масс.% (Рисунок 49), в значительной степени увеличивает удерживание цис-изомера, в тоже время удерживание *транс-ДГИТ* и тиомочевины увеличивается незначительно. Известно, что удерживание исследуемых веществ на неподвижной фазе, модифицированной солями кальция, обуславливается устойчивостью комплекса, образованного между металлом и аналитами. Наибольшая сила координационного взаимодействия между кальцием и двумя гидроксильными группами цис-ДГИТ, однако, сила взаимодействия одной гидроксильной группы меньше, чем одной аминогруппы тиольной формы тиомочевины с модифицированной поверхностью пластины [90].



Рисунок 48 – Предполагаемое взаимодействие ацетата кальция с поверхностью TCX пластины

Увеличение концентрации соли на поверхности силикагеля приводит к перекрыванию силанольных групп и нивелирует их влияние на удерживание *mpaнc*-ДГИТ и тиомочевины. Нами замечено, что с увеличением содержания гексана разрешение между геометрическими изомерами уменьшается, что очевидно связано со сменой хроматографического режима на нормальную фазу.

58



Рисунок 49 – Зависимость фактора удерживания ТМ и изомеров ДГИТ от количества Ca(CH₃COO)₂ в неподвижной фазе; подвижная фаза: гексан:изопропиловый спирт (40:60, объемн.)

При разделении смеси *N,N'*-диметил замещенных тиомочевины и ДГИТ на пластине, модифицированной ацетатом кальция, происходит изменение порядка элюирования между *цис*-ДиМеДГИТ и ДиМеТМ, в сравнении с немодифицированной пластиной. Увеличивается удерживание *цис*-ДГИТ, благодаря координационному взаимодействию его двух гидроксильных групп с кальцием (Рисунок 50). Удерживание *транс*-ДГИТ и тиомочевины с увеличением содержания кальция уменьшается, из-за перекрывания силанольных групп, и отсутствием адсорбционного взаимодействия полярных групп аналита и сорбента.



Рисунок 50 – Зависимость фактора удерживания ДиМеТМ и изомеров ДиМеДГИТ

от количества Са(СН3СОО)2 в неподвижной фазе;

подвижная фаза: гексан:изопропиловый спирт (50:50, объемн.)

59

Если принять условие, что основным взаимодействием между неподвижной фазой и аналитами, является донорно-акцепторное взаимодействие между тионными формами и гидроксильными группами геометрических изомеров ДГИТ, то предположительная схема взаимодействия аналитов с модифицированной неподвижной фазой представлена на Рисунке^о51.



Рисунок 51 – Предполагаемая схема удерживания аналитов на пластине, модифицированной ацетатом кальция

Таким образом, выбраны оптимальные условия разделения замещенных и незамещенных геометрических изомеров ДГИТ: пластина Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, модифицированная 1,5% раствором ацетата кальция, подвижная фаза: гексан:изопропиловый спирт (40:60, объемн.) (Рисунок 52).



Рисунок 52 – Разделение аналитов на пластине,

модифицированной раствором ацетата кальция с концентрацией 1,5 масс. %; подвижная фаза: гексан:изопропиловый спирт (40:60, объемн.)

Основные харакетристики веществ при их определнии методом TCX представлены в таблице 7. Разрешение между изомерами (R_s) определяли как расстояние между центрами хроматографических зон (ΔX), деленное на среднеарифметическое их ширин (w) (1).

$$R_{s} = \frac{\Delta X}{\frac{1}{2} \times (w_{2} - w_{1})}$$
(1)

Разрешение между изомерами (R_s) *цис*- и *транс*- ДГИТ по методике составляет 1,9, разрешение между изомерами *цис*- и *транс*- ДиМеДГИТ составляет 1,13. Значения R_s свидетельствуют о полном разделении веществ.

	TM	<i>цис-</i> ДГИТ	транс-ДГИТ	ДиМеТМ	<i>цис-</i> ДиМеДГИТ	транс-
						ДиМеДГИТ
R _f	0,79	0,54	0,84	0,76	0,72	0,88
W	-	0,4-0,63	0,7-0,91	-	0,6-0,75	0,83-0,98
Rs]	,9		1,13	3

Таблица 7 – Характеристики изомеров ДГИТ разделенных с помощью ТСХ

Нами установлено, что больший вклад в удерживание анализируемых веществ на пластине, модифицированной медью, вносит тиоамидная группа, а не гидроксильные группы. Ацетат кальция показывает хорошую селективность по отношению к пространственным гидроксилсодержащим изомерам ДГИТ. Для подтверждения взаимодействия аналитов с ацетатом кальция, так как аналиты содержат хромофорные группы -C=S и -N-H-.

Исследование взаимодействия тиомочевины, 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона и их N,N'-диметилпроизводных с ацетатом кальция с применением УФ-спектроскопии

Наличие хромофорных групп -C=S и -N-H- в молекулах исследуемых соединений позволяет исследовать их с помощью УФ-спектроскопии. Поэтому для объяснения механизма разделения веществ на пластине для TCX, модифицированной ацетатом кальция, были сняты УФ-спектры водных растворов TM, ДиМеТМ и соответствующих им ДГИТ, а также раствора ацетата кальция и его смесей с исследуемыми веществами.







Рисунок 54 – УФ-спектры вычитания раствора Ca(Ac)2из его с меси с: 1'-тиомочевиной; 2'-1,2-диметилтиомочевиной; 3'-ДГИТом; 4'-ДиМеДГИТом

Первый максимум поглощения тиомочевины при 196 нм соответствует n- π^* переходу электронов аминогрупп, а второй максимум поглощения 235 нм характеризует электронные переходы π - π^* группы -C=S (Рисунок 53) [59]. Замена двух атомов водорода на метильные группы, обладающие положительным индуктивным эффектом в тиомочевине, приводит к батохромному сдвигу первого максимума 206 нм 1,3-диметилтиомочевины и небольшому гипсохромному сдвигу второго максимума до 232 нм, в сравнении с незамещенной тиомочевиной, из-за положительного индуктивного эффекта метильных групп ДиМеТМ [91].

Спектр ДГИТ имеет полосу поглощения с максимумом 238 нм, который соответствует *π*-*π** электронному переходу группы -C=S. Вторая полоса поглощения 204 нм характеризует n-*π** переход в -N-H- группе и образование тиольной формы ДГИТ. Наличие метиновых групп, соединенных с гидроксильными группами в молекуле ДГИТ, приводит к батохромному сдвигу полос поглощения ДГИТ относительно тиомочевины, а также наблюдаем гипохромный эффект первой полосы.

В УФ-спектре ДиМеДГИТ наблюдается гипохромный эффект первой полосы поглощения и небольшой гипсохромный эффект в сравнении с УФ-спектром незамещенного ДГИТ. Это обстоятельство может также свидетельствовать о взаимодействии сигма электронов метильной группы с хромофорными группами ДГИТ, по аналогии с исходными замещенными тиомочевинами.

62

Поглощение ацетата кальция в УФ области связано с электронными переходами $n-\pi^*$ карбоксильной группы с максимумом поглощения в дальней области УФ-спектра (Рисунок 53). В УФ-спектрах смеси ацетата кальция с исследуемыми соединениями максимумы поглощения соответствуют максимумам поглощения индивидуальных веществ, поэтому для понимания взаимодействия между реагентами был использован принцип аддитивности. При определенной длине волны, если компоненты смеси не взаимодействуют друг с другом и не образуют комплекс, то сумма оптических плотностей компонентов в смеси равна оптической плотности смеси (2).

$$D = \sum \varepsilon_n \cdot l \cdot C_n \tag{2}$$

При вычитании УФ-спектров индивидуальных веществ из УФ-спектров смесей с ацетатом кальция наблюдается небольшой гипохромный сдвиг первого макисмума, соответствующего электронным переходам -NH- группы и принадлежащей к тиольной форме тиомочевины, с максимальным значением для тиомочевины и незамещенного ДГИТ (Рисунок°54), что подтверждает экспериментальные результаты, полученные с помощью TCX. Наибольшее удерживание незамещенных аналитов на модифицированной ацетатом кальция TCX-пластине.

TCX методика определения транс-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона в смеси с цис-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тионом

Следующим этапом наших исследований являлось определение геометрических изомеров ДГИТ методом TCX с использованием видеоденситометрии. TCX хроматограмма изомеров ДГИТ приведена на рисунке 55, характеристики хроматографических пиков, рассчитанные программой «Sorbfil Videodensitometer» приведены в таблице 8.

			Содержание	Яркость,	Асимметрия	Разрешение,	Число
Название	R_{f}	$S_{пик}$	в смеси, %	Н	пика, As	Rs	теоретических
							тарелок, N
Цис-	0.54	7286	34.3	425	0.44	19	353
ДГИТ	- ,	,		725	*,**	1,9	
Транс-	0.84	13979	65.7	1320	0.73		1951
ДГИТ	0,01	13717		1520	0,75		1701

Таблица 8 – Характеристики изомеров ДГИТ, разделенных с использованием ТСХ

Селективность ТСХ методики оценивали по значению R_s между геометрическими изомерами ДГИТ. По значению R_s=1,9, можно сделать вывод, что вещества полностью разделены и методика селективна (Таблица 8).



Рисунок 55 – а – Фото ТСХ-пластины разделения *цис*- и *транс*-ДГИТ, **б** – ТСХ хроматограмма *цис*- и *транс*-ДГИТ; ω Ca(CH₃COO)₂ = 1,5 масс.%; подвижная фаза: гексан:изопропиловый спирт (40:60, объемн.)

Специфичность определяли по величине R_f пятна анализируемого ДГИТ, которое соответствовало R_f пятна стандартного образца для *транс*-ДГИТ ($R_f = 0,73$) и по интенсивности окраски соответствовало стандартному образцу *транс*-ДГИТ.

Для определения линейности методики, были приготовлены растворы транс-ДГИТ.

Калибровочные растворы *транс*-ДГИТ для построения градуировочной кривой готовили из образца, который предварительно хорошо промывали дистиллированной водой для очистки от возможных примесей тиомочевины и *цис*-ДГИТ. Чистоту подтверждали с помощью протонного спектра ДГИТ. Наносили на линию старта 0,2 мкл *транс*-ДГИТ, затем хроматографировали (Таблица 9).

С (ДГИТ) мг/мл	Яркость, Н	С (ДГИТ) на пластине, мкг
0,25	50	0,3040
0,48	273	0,6150
0,86	544	3,8435
1,108	655	3,0400
1,70	1088	7,687

Таблица 9 – Зависимость концентрации *транс*-ДГИТ от яркости пятна на хроматограмме

Согласно полученным при хроматографировании растворов *транс*-ДГИТ данным, построена градуировочная зависимость с коэффициентом $R^2 = 0,99$, в диапазоне определяемых концентраций 0,3–7,7 мкг, методика линейна: H = 855,04C + 836,09, (Рисунок 56). Содержание *транс*-ДГИТ в смеси определяют по одновременному хроматографированию известной концентрации раствора *транс*-ДГИТ, в диапазоне 0,3–7,7 мкг *транс*-ДГИТ на пластине, и смеси с неизвестным содержанием *транс*-ДГИТ, и рассчитывают содержание изомеров в % с использованием программы «Sorbfil Videodensitometer».



Рисунок 56 – Градуировочная зависимость яркости пятна

от содержания *транс*-ДГИТ на пластине ПТСХ-В-А-УΦ, ω Ca(CH₃COO)₂ = 1,5 масс.%; подвижная фаза: гексан:изопропиловый спирт (40:60, объемн.)

Показатель повторяемости методики оценивали как СКО в условиях повторяемости, показатель промежуточной прецизионности оценивали как СКО в условиях прецизионности, показатель правильности и точности, как расширенную неопределенность. В диапазоне концентраций от 3,0 до 7,7 мкг транс-ДГИТ на пластине показатель повторяемости и промежуточной прецизионности не превышает 7,5%, показатель правильности 5,7 % и точности 11,1% (Таблица 10). Подробный расчет представлен в приложении А. Кроме того, оценена систематическая погрешность по t-критерию, установлено, что она не значима на фоне случайного разброса.

Следующим этапом работы являлось разделение и количественное определение геометрических изомеров ДиМеДГИТ. Для разделения геометрических изомеров ДиМеДГИТ методом TCX, использовалась смесь, полученная по методике, представленной в

экспериментальной части, где содержание *цис*-изомера находится ниже уровня ПКО (Рисунок°57).

С	Показ	атель	Показатель пр	омежуточной	Показатель		Показатель	
транс-	повторя	емости	прецизи	онности	правильности		точности	
ДГИТ, мкг	σ, мкг	σ _{г,л,} %	σ _{R, л,} мкг	σ _{R, л} , %	U _θ ,	U _{θ,} %	U _m , мкг	U _m , %
					МКГ			
0,3	0,02	11,7	0,04	27,6	0,15	50,1	0,09	29,8
0,6	0,03	4,0	0,07	10,1	0,11	19,2	0,16	26,4
3,0	0,2	7,0	0,22	7,5	0,17	5,7	0,33	11,1
4,0	0,11	2,7	0,21	5,1	0,21	5,3	0,43	10,7
7,7	0,41	5,3	0,37	4,8	0,18	2,4	0,38	4,9

Таблица 10 – Метрологические характеристики методики количественного определения *транс-ДГИТ* в смеси с *цис-ДГИТ* методом ТСХ

Поскольку *цис*- изомер не выделен в чистом виде, количественное определение изомера не представляется возможным, так как при нанесении на пластину большей концентрации смеси ДиМеДГИТ теряется разрешение между изомерами. Поэтому приводятся только качественные характеристики разделения изомеров методом TCX. Разделение геометрических изомеров происходит до базовой линии со значением 1,13, поэтому можно считать, что изомеры разделены полностью. Приблизительное содержание геометрических изомеров в % можно оценить с использованием программы «Sorbfil Videodensitometer» по яркости пятен (Таблица 11).

Таблица 11 – Характеристики геометрических изомеров ДиМеДГИТ разделенных методом TCX

			Содержание	Яркость,	Асимметрия	Разрешение,	Число
Название	R_{f}	Sпик	в смеси, %	Н	пика, As	Rs	теоретических
							тарелок, N
Цис-ДиМеДГИТ	0,72	2443	10,8	329	0,44	1 13	353
Транс-ДиМеДГИТ	0,88	20244	89,2	2508	0,71	1,15	1764



Рисунок 57 – а – ТСХ хроматограмма *цис*- и *транс*-ДиМеДГИТ; б – Фото ТСХпластины разделения *цис*- и *транс*-ДиМеДГИТ; пластина ПТСХ-В-А-УФ, ω Ca(CH₃COO)₂ = 1,5 масс.%;

подвижная фаза: гексан:изопропиловый спирт (50:50, объемн.)

Таким образом, разработана количественная ТСХ методика определения *транс*-ДГИТ в смеси с *цис*-ДГИТ. В диапазоне определяемых концентраций 0,3–7,7 мкг методика линейна, селективна и специфична. ТСХ методика пригодна для определения содержания геометрических изомеров в смеси, однако трудоемка для изучения кинетики процесса образования ДГИТ, поэтому следующий шаг работы – разработка методики количественного определения и разделения тиомочевины и геометрических изомеров ДГИТ методом ВЭЖХ.

Разработка и оптимизация условий разделения цис- и транс-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона методом ВЭЖХ*

Подбор стационарной фазы и элюента. Для детектирования ДГИТ была выбрана длина волны при 238 нм, исходя из максимума его поглощения в УФ-области. Из-за существенного различия в растворимости изомеров ДГИТ в воде, можно попробовать разделить их между собой в ОФ режиме ВЭЖХ. Однако использование колонки C₁₈ PerfectSil Target ODS-3 HD 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм с подвижной фазой вода:ацетонитрил (99:1,объемн.) не позволило разделить изомеры ДГИТ (Рисунок 58А). Замена подвижной фазы на 100% воду не привело к лучшему разделению изомеров ДГИТ. Поэтому была выбрана колонка C₈ Zorbax Eclipse Plus C₈ 4,6×250 мм, размер частиц 5 мкм, как менее гидрофобная по сравнению с C₁₈, без изменения состава элюента. Это привело к неполному разделению *цис*-ДГИТ (k = 0,3) и *транс*-ДГИТ (k = 0,2) с

^{*}подраздел выполнялся Мамко К. Е.

разрешением (Rs) = 1,3 (Рисунок 57Б). Похожие результаты были получены при использовании колонки Luna 5u PFP 100 Å (2) (150×4.6 мм, 5 мкм), с аналогичными подвижными фазами за исключением того, что удерживание немного увеличилось, а разрешение между изомерами ДГИТ уменьшилось (Rs = 0,7) [92].



Рисунок 58 – Хроматограммы модельной смеси геометрических изомеров ДГИТ в ОФ ВЭЖХ: **A** – фаза C₁₈ (колонка Target ODS 3 HD, 250×4,6 мм, 5 мкм размер частиц), мобильная фаза: вода:ацетонитрил (95:5, объемн.); **Б** – фаза C₈ (колонка Zorbax Eclipse Plus C₈, 4,6×250 мм, 5 мкм размер частиц), мобильная фаза вода:ацетонитрил (99:1, объемн.)

Полученные результаты показали, что режим ОФ ВЭЖХ не показывает селективности к разделению геометрических изомеров. А элюирование ДГИТ с минимальным коэффициентом удерживания, обусловлено его растворимостью в воде. По этой же причине произошло неполное разделение хорошо растворимого – *цис*-ДГИТ и менее растворимого в воде *транс*-ДГИТ. Распределительный механизм, преимущественно реализованный в режиме ОФ°ВЭЖХ, не обеспечивает достаточной региоселективности для разделения изомеров, поэтому был выбран режим НФ ВЭЖХ, с большим вкладом адсорбционных взаимодействий между аналитом и стационарной фазой.

В НФ ВЭЖХ в качестве стационарной фазы использовали колонку Zorbax RX-SIL Analytical 4,6×150 мм, размер частиц 5 мкм, которая состоит из немодифицированного силикагеля. Силикагель, как известно, преимущественно связывает аналиты за счет сильного полярного взаимодействия, поэтому фактор удерживания анализируемых веществ должен быть пропорционален концентрации полярных групп. Наличие двух гидроксильных и амино- групп приводит к сильному удерживанию ДГИТ, поэтому для уменьшения его удерживания в подвижную фазу гексан:изопропанол добавляли модификатор 1,2-пропандиол. Подвижная фаза гексан:изопропанол:1,2-пропандиол (94:5:1, объемн.) обеспечивала высокое удерживание и хорошее разделение *транс-*ДГИТ (k = 20,8) и *цис-*ДГИТ (k = 19,5, Rs = 1,8) (Рисунок 59A), однако время анализа составляло 15 мин, что не допустимо для изучения кинетики реакции.



Рисунок 59 – Хроматограммы модельной смеси геометрических изомеров ДГИТ: **A** – НФ ВЭЖХ, колонка Zorbax RX-SIL Analytical 4.6×150 мм, 5 мкм размер частиц), мобильная фаза гексан:изопропанол:1,2-пропандиол (94:5:1, объемн.); **Б** – ВНФ на сшитой диольной фазе, колонка Luna HILIC 200Å, 4.6×150 мм, 5 мкм размер частиц), мобильная фаза ацетонитрил:вода (95:5, объемн.); **В** – НФ ВЭЖХ, на сшитой диольной фазе (Luna HILIC 200 Å, 4.6×150 мм, 5 мкм размер частиц), мобильная фаза ацетонитрил: гексан:бутанол (90:5:5, объемн.).

При использовании NH₂ фазы и подвижной фазы ацетонитрил:вода, (98:2, объемн.) элюируется смесь изомеров с фактором удерживания (k=2,5). Это связано с тем, что

стационарная фаза представляет собой привитые на силикагель аминоприпильные группы, а основа модифицирована триметилсилилхлоридом с образованием липофильных групп (-Si-O-Si-(-CH 3)3), для разделения липофильных соединений.

Необходимо было выбрать фазу, которая способствует разделению гидрофильного *цис*изомера и гидрофобного *транс*-изомера. Колонка Luna HILIC 200 Å4,6 × 150 мм, размер частиц 5 мкм с стационарной фазой на основе сшитой диольной фазы, которая образует полимерный слой на поверхности диоксида кремния, содержащий оксиэтилен и гидроксильные группы.

Стационарная фаза содержит гидроксильные группы, которые являются донорами и акцепторами водородных связей, а также участвуют в диполь-дипольных взаимодействиях; эфирные группы, (-CH₂-O-) с диполь-дипольной и акцепторной активностями, а также метиленовые группы с липофильной активностью (Рисунок 60) [93, 94]. Благодаря тому, что силанольные группы блокированы, практически исключается необратимая адсорбция полярных соединений на поверхности силикагеля, такой сорбент должен обеспечивать более сильные гидрофобные взаимодействия, чем простая диол-фаза и позволит одновременно разделить вещества с разной липофильностью.



Рисунок – 60 Сшитая диольная фаза колонка Luna HILIC

Использование элюента (95:5, объемн.) позволило разделить все вещества с коэффициентом удерживания соединений соответственно, равным: 0,7 и 0,6 для *транс-* и *цис-*ДГИТ соответственно, и Rs = 3,1 (Рисунок 59Б). Порядок элюирования изомеров меняется в сравнении с НФ ВЭЖХ на SiO₂ фазе, *транс-*ДГИТ лучше удерживается, чем *цис-*ДГИТ из-за большего вклада межмолекулярных водородных связей с диольной фазой.

Реализуемые условия хроматографического разделения могут относится к водной нормально фазовой хроматографии (ВНФХ) или HILIC (гидрофильная хроматография). Поэтому для установления типа хроматографического режима, воду в подвижной фазе заменили на раствор формиата аммония (5–50 мг), при этом удерживание веществ не изменилось. Следовательно, удерживание и разрешение между соединениями не зависит от рН подвижной фазы. Уменьшение воды в подвижной фазе от 5 до 1 масс.% приводит к увеличению разрешения между изомерами ДГИТ до 3,24. Замена воды на смесь бутанола:гексана и использование

подвижной фазы ацетонитрил:гексан:бутанол увеличивает удерживание изомеров ДГИТ, также меняется форма пиков ДГИТ (Рисунок 59**B**). Таким образом, уменьшение количества воды, и как следствие-уменьшение элюирующей силы подвижной фазы в системе, приводит к большему взаимодействию аналита и стационарной фазы с увеличением разрешения между изомерами, то есть преобладает адсорбционный механизм удерживания, реализуемый в НФ ВЭЖХ.

В режиме HILIC обычно не удается разделить смесь гидрофильных и гидрофобных веществ. Разделение веществ происходит за счет распределения анализируемых соединений между преимущественно органической подвижной фазой и образующимся водным слоем на поверхности сорбента, благодаря адсорбции воды из элюента поверхностными полярными группами сорбента. Для образования такого слоя необходимо не менее 5 масс.% воды в подвижной фазе [95]. ВНФХ представляет собой метод, в котором реализуется ОФ ВЭЖХ (наличие неполярной стационарной фазы и более полярного растворителя) и НФ ВЭЖХ (увеличение удерживания аналитов с увеличением полярности элюента). Поэтому мы предполагаем, что разделение веществ на колонке Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм с элюентом ацетонитрил:вода (95: 5, объемн.) относится к ВНФХ.

Идентификация хроматографических пиков. Подтверждение одинаковой природы предполагаемых хроматографических пиков изомеров проводили по спектральным отношениям, рассчитанным после детектирования на трех длинах волн – 229 нм, 238 нм и 245°нм (Рисунок 61). Спектральные отношения (Таблица 12) подтверждают близкую природу хроматографических пиков с фактором удерживания k' 0,6 и 0,7.

	Спектральные отношения $S(\lambda_1)/S(\lambda_2)^*$				
Отношение длин вол н $\lambda_1\!/\lambda_2$	k' =0,6	k' = 0,7			
	(цис-ДГИТ)	(транс-ДГИТ)			
229/245	0,2	0,2			
229/238	0,3	0,3			
238/245	0,6	0,6			
* отношение площадей хроматографических пиков при детектировании на различных длинах					

Таблица 12 – Спектральные отношения пиков цис- и транс-ДГИТ

волн

По данным ¹Н ЯМР-спектроскопии (Глава 3.3) в исследуемых образцах присутствуют преимущественно *транс*-изомеры, поэтому сигналы с большей площадью – фактор удерживания 0,7 принадлежат *транс*-ДГИТ.



Рисунок 61 – Хроматограмма ДГИТ и с детектированием на трех длинах волн: 1 – 245 нм, 2 – 238 нм, 3 – 229 нм

Методика определения геометрических изомеров ДГИТ необходима для контроля реакции между тиомочевиной и глиоксалем, а также для изучения кинетики этой реакции. Поэтому важным критерием определения тиомочевины и геометрических изомеров ДГИТ в реакционной массе, является время анализа без существенной потери разрешения сигналов. Ввиду этого следующим этапом нашей работы было определение оптимального времени анализа. При увеличении скорости потока уменьшается разрешение между анализируемыми компонентами, при скорости потока 1,8 мл/мин разрешение между изомерами составляет: 1; между тиомочевиной и *цис*-ДГИТ 0,8. При скорости потока 1 мл/мин, разрешение между изомерами 1,5, однако время анализа 6 мин. При скорости потока 1,5 мл/мин, разрешение между изомерами и *цис*-ДГИТ 1,3. В связи с этим была выбрана скорость потока 1,5 мл/мин и временем анализа 2,6°мин.

Предложенные условия анализа также пригодны для одновременного разделения тиомочевины и геометрических изомеров ДГИТ. Таким образом разработана методика разделения и определения тиомочевины, геометрических изомеров ДГИТ в реакционной массе. Провели оценку метрологических характеристик методики определения тиомочевины, *цис-* и *транс-*4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона в реакционной смеси методом ВЭЖХ.

Селективность методики оценивали по разрешению Rs между тиомочевиной и цис-ДГИТ, а также между геометрическими изомерами ДГИТ. Оценку разрешения пиков проводили в соответствии с формулой 3.

$$R_{s} = \frac{2 \cdot \Delta t}{W_{1} + W_{2}} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_{1} + W_{2}}$$
(3)

В выбранных условиях, в модельной смеси, состоящей из тиомочевины и изомеров ДГИТ, разрешение Rs между геометрическими изомерами составляет 1,5, а между тиомочевиной и *цис*-ДГИТ – 1,3, что является приемлемым для данной методики. Методика обеспечивает
достаточный уровень селективности – хроматографические пики тиомочевины и геометрических изомеров ДГИТ не накладываются друг на друга.

Специфичность методики определяли добавлением в модельную смесь тиогидантоина (Рисунок 62). По существующим данным, тиогидантоин может образовываться в результате получения ДГИТ и являться его сопутствующей примесью. В результате хроматографирования приготовленной смеси, можно сделать вывод, что методика специфична для тиомочевины, ДГИТ и возможной сопутствующей примеси – тиогидантоина.



Рисунок 62 – Хроматограмма модельного раствора тиогидантоина, тиомочевины, геометрических изомеров ДГИТ для определения специфичности методики; колонка Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, элюент ацетонитрил:вода (95: 5, объемн.)

Для разработки методики определения геометрических изомеров ДГИТ и тиомочевины, был взят диапазон концентраций для тиомочевины от 0,8–0,02 мг/мл, для *цис*-ДГИТ от 0,15–0,003 мг/мл, для *транс*-ДГИТ от 0,85–0,017 мг/мл, согласно необходимым условиям кинетического эксперимента. В соответствии с выбранным диапазоном концентраций приготовлены растворы. *Приготовление растворов тиомочевины*

Исходный рабочий раствор 1 был приготовлен методом навески из 200 мг тиомочевины в 100 мл смеси ацетонитрила/воды (95:5, объемн.), с получением раствора тиомочевины с концентрацией 2 мг/мл. Исходный рабочий раствор 2 готовили растворением 80 мг тиомочевины в 10 мл смеси ацетонитрила:воды (95:5, объемн.) с получением концентрации 0,8 мг/мл. Остальные растворы были приготовлены методом разбавления исходного раствора 1 (Таблица 13).

Название	Depher and the mean of the	Объем	Объем	Концентрация
раствора	Разоавляемый раствор	аликвоты, мл	колбы, мл	раствора, мг/мл
Раствор 1	Исходный рабочий раствор 1	2	10	0,4
Раствор 2	Раствор 1	5	10	0,2
Раствор 3	Раствор 2	5	10	0,1
Раствор 4	Исходный рабочий раствор 1	1	25	0,08
Раствор 5	Раствор 1	2	25	0,032
Раствор 6	Раствор 2	1	10	0,02

Таблица 13 – Приготовление рабочих растворов тиомочевины для построения градуировочного графика

Полученные растворы использовали для построения градуировочной кривой и оценки метрологических характеристик методики.

Согласно полученным при хроматографировании растворов тиомочевины данным, построена градуировка с коэффициентом $R^2 = 0,9994$ и уравнением прямой: y = 0,0001x + 0,0081, из которой следует, что в области концентраций от 0,8–0,02 мг/мл методика линейна (Рисунок 63).



Рисунок 63 – Градуировочная зависимость концентрации тиомочевины от площади хроматографического пика; колонка Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, элюент ацетонитрил:вода (95: 5, объемн.)

Оценены метрологические характеристики методики определения тиомочевины методом ВЭЖХ по РМГ 61 2010, (P = 0,95, n = 3, 1 = 5). Показатель повторяемости методики оценивали как СКО в условиях повторяемости, показатель промежуточной прецизионности оценивали как СКО в условиях прецизионности, показатель правильности и точности, как расширенную неопределенность. Все показатели приемлемы для количественного определения тиомочевины и геометрических изомеров в кинетическом эксперименте (Таблица 14).

Таблица 14 – Метрологические характеристики методики определения тиомочевины при получении ДГИТ методом ВЭЖХ

С	Показ	атель	Показатель		Показатель		Показатель точности	
тиомочевины,	повторя	емости	промежуточной		правильности			
моль/л			прецизи	онности				
	σг,л,	σг,л, %	σ R, л	σ к, л, %	Uθ,	Uθ, %	Um,	Um, %
	моль/л		моль/л		моль/л		моль/л	
0,02	0,0002	1,0	0,0004	1,9	0,005	24,6	0,01	25,0
0,08	0,002	2,2	0,002	2,7	0,002	2,7	0,01	7,8
0,2	0,002	1,3	0,007	3,7	0,009	4,8	0,02	8,3
0,4	0,004	1,2	0,015	3,0	0,013	3,6	0,03	6,4
0,8	0,005	0,7	0,01	1,3	0,012	1,5	0,02	2,8

Приготовление растворов ДГИТ

Исходный рабочий раствор 3 был приготовлен методом навески растворением 247,6 мг смеси *транс-* и *цис-*ДГИТ в 25 мл смеси вода:ацетонитрил (95:5, объемн.) с получением раствора с концентрацией 9,9 мг/мл. Остальные растворы готовились методом разбавления (Таблица15). Содержание изомеров в смеси определили методом ¹Н ЯМР по отношению интегральных интенсивностей сигналов метиновых групп. Исходная рацемическая смесь ДГИТ состоит из 15 % *цис-*, и 85 % *транс-* изомера. Согласно полученным при хроматографировании растворов *транс-*ДГИТ данным, построена градуировка с коэффициентом $R^2 = 0,9999$ и уравнением прямой: у = 0,0002x + 0,0015, из которой следует, что в области концентраций от 0,8–0,02 мг/мл методика линейна (Рисунок 64).

				Концентрация	Концентрация	Концентрация
No	Рообориясын	Объем	Объем	раствора	раствора	раствора <i>цис-,</i>
	газоавляемыи	аликвоты,	колбы,	смеси транс-	транс-,	ДГИТ, мг/мл
раствора	раствор	МЛ	МЛ	,цис-ДГИТ,	ДГИТ, мг/мл	
				мг/мл		
	Исходный					
1	рабочий	1	10			
	раствор 3			1	0,85	0,15
	Исходный					
2	рабочий	1	25			
	раствор 3			0,4	0,34	0,06
	Исходный					
3	рабочий	1	10			
	раствор 3			0,1	0,085	0,015
	Исходный					
4	рабочий	1	25			
	раствор 3			0,04	0,034	0,006
	Исходный					
5	рабочий	5	25			
	раствор3			0,02	0,017	0,003

Таблица 15 – Приготовление рабочих растворов *цис*- и *транс*-ДГИТ



Рисунок 64 – Градуировочная зависимость концентрации *транс*-ДГИТ от площади хроматографического пика; колонка Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, элюент ацетонитрил:вода (95: 5, объемн.)

Согласно полученным при хроматографировании растворов *цис*-ДГИТ данным, построена градуировка с коэффициентом $R^2 = 0,9996$ и уравнением прямой: y = 0,0003x + 0,0005, из которой следует, что в области определяемых концентраций от 0,15–0,003 мг/мл методика линейна (Рисунок 65).



Рисунок 65 – Градуировочная зависимость концентрации *цис*-ДГИТ от площади хроматографического пика; колонка Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, элюент ацетонитрил:вода (95: 5, объемн.)

Для определения *чувствительности* методики хроматографировали растворы анализируемых веществ с минимальной концентрацией в градуировке. Для тиомочевины с концентрацией 0,02 мг/мл соотношение сигнала к шуму S/N=235 (Рисунок 66), поэтому минимальная концентрация тиомочевины по методике выше ПО.



Рисунок 66 – Хроматограмма раствора тиомочевины с концентрацией 0,02 мг/мл; колонка Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, элюент ацетонитрил:вода (95:5, объемн.)

Хроматограмма растворов *цис-* и *транс-*ДГИТ с концентрацией 0,003 и 0,017 мг/мл, соответственно, представлена на Рисунке 67, из которого следует, что отношение аналитического сигнала к шуму составляет 40 и 340, для *цис-* и *транс-*ДГИТ, соответственно. Поэтому минимальная концентрация для изомеров ДГИТ по методике выше ПО.



Рисунок 67 – Хроматограмма раствора геометрических изомеров ДГИТ для определения чувствительности методики; колонка Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, элюент ацетонитрил:вода (95:5, объемн.)

Разработанную ВЭЖХ методику определения тиомочевины, *цис-* и *транс-*ДГИТ в реакционной массе, использовали для изучения кинетики процесса взаимодействия тиомочевины и глиоксаля, которой посвящена следующая часть диссертации.

3.5 Применение ВЭЖХ методики определения тиомочевины, геометрических изомеров ДГИТ и результатов ЯМР-спектроскопии для исследования пути протекания реакции между тиомочевиной и глиоксалем

Для кинетического эксперимента использовали мольное соотношение реагентов: тиомочевина:глиоксаль 1:1, С реагентов= 1 моль/л, Т синтеза = 30 °C. Для остановки реакции 0,2 мл реакционной массы разбавляли 0,8 мл CH₃CN при температуре 2–5 °C [96]. Пробы до анализа хранили в холодильнике при температуре 2–5 °C. Условия ВЭЖХ анализа, разработанные для определения геометрических изомеров ДГИТ и тиомочевины были использованы для определения концентрации тиомочевины и ДГИТ в реакционной смеси при

изучении кинетики процесса. Типичная хроматограмма смеси *цис-* и *транс-* ДГИТ и тиомочевины показана на рисунке 68.



Рисунок 68 – Хроматограмма реакционной смеси при изучении кинетики реакции тиомочевины с глиоксалем; колонка Luna HILIC 200 Å 4,6×150 мм, элюент ацетонитрил:вода (95:5, объемн.)

В результате кинетического эксперимента были получены кривые изменения концентрации тиомочевины и ДГИТ во времени (Рисунок 69). Из которых видно, что при конверсии тиомочевины в 98,8%, выход ДГИТ составил~65%, что свидетельствует о протекании побочных реакций. В главе 3.3 диссертации, с использованием ЯМР-спектроскопии установлено, что в результате реакции тиомочевины с глиоксалем помимо геометрических изомеров ДГИТ, образуются его кислород содержащий аналог *-цис* и *транс-* ДГИ и 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тион.



Рисунок 69 – Кинетические кривые синтеза ДГИТ: треугольники –экспериментальные данные, линия – расчет по модели с найденными коэффициентами

Результаты кинетического эксперимента и исследования продуктов реакции с использованием ЯМР-спектроскопии позволяют предположить механизм образования побочных продуктов. Причем в динамическом ЯМР эксперименте, установлено, что в процессе синтеза, после образования соединений геометрических изомеров ДГИТ, происходит увеличение сигнала протонов метиновой группы 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тиона, а затем появляются сигналы метиновых групп *иис*- и *транс*-ДГИ, что говорит о последовательности образования соединений. Наличие кислородсодержащих аналогов ДГИТ, свидетельствует о взаимодействии глиоксаля с мочевиной, но изначально в реакционной массе она отсутствовала, вероятнее всего она образуется в результате побочных реакций. По нашему предположению, по аналогии с механизмом взаимодействия тиомочевины с бензилом тиомочевина взаимодействует с ДГИТ с 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тиона и серы, образованием мочевины, далее мочевина взаимодействует с глиоксалем с образованием ДГИ (Рисунок 70) [97].



Рисунок 70 – Механизм образования побочных продуктов в синтезе ДГИТ

Предложенная схема образования побочных продуктов ДГИТ, легла в основу предположенной кинетической модели системы. На рисунке 71 представлена схема образования ДГИТ и побочных реакций, протекающих в реагирующей системе.



Рисунок 71 – Схема реакций в реагирующей системе

Подтверждением адекватности предложенной схемы, может выступать способность математической модели, построенной на основе схемы, адекватно описывать экспериментальные данные. Схема реакций описывается системой ОДУ, содержащей 3 кинетических константы:

$$\begin{aligned} c_1' &= -k_1 c_1 c_2 - k_2 c_1 c_3 \\ c_2' &= -k_1 c_1 c_2 - k_3 c_5 c_2 \\ c_3' &= k_1 c_1 c_2 - k_2 c_3 c_1 \\ c_4' &= k_2 c_3 c_1 \\ c_5' &= k_2 c_3 c_1 - k_3 c_5 c_2 \\ c_6' &= k_3 c_5 c_2 \\ c_1(0) &= c_1^0, \ c_2(0) &= c_2^0, c_3(0) = c_4(0) = c_5(0) = c_6(0) = 0 \end{aligned}$$

Кинетические параметры k₁, k₂, k₃ находились как координаты минимума суммы квадратов отклонений расчетных концентраций тиомочевины и ДГИТ по модели от экспериментальных данных (Рисунок 71). Поиск минимума проводился с помощью алгоритма Недледера-Мида с многократным запуском [98]. Для нахождения расчетных концентраций проводилось численное интегрирование системы обыкновенных дифференциальных уравнений с помощью полунеявной двухстадийной L-устойчивой схемы Розенброка с комплексными коэффициентами (4 порядка точности) [99]. Расчет проводился на серии сгущающихся сеток с оценкой погрешности вычислений по методу Ричардсона [100]. На рисунке 69 показано сравнение расчетной кривой по модели с экспериментальными данными. Видно, что предложенная схема удовлетворительно описывает экспериментальные данные.

На основании результатов ЯМР и ВЭЖХ анализа предложена кинетическая модель масштабируемого процесса синтеза ДГИТ и рассчитаны ее параметры [101, 102]. Предложена схема реакций, объясняющая образование побочных продуктов ДГИТ. Модель хорошо описывает кинетику образования ДГИТ, расхода тиомочевины и может быть использована при моделировании технологических процессов и реакционного оборудования.

Выводы

1. Методом УФ-спектроскопии установлено, что тионная форма тиомочевины преобладает в водно-спиртовых растворителях с низкой диэлектрической проницаемостью в нейтральной среде. Содержание тионной формы тиомочевины при добавлении кислоты преобладает в воде, поэтому получение 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона необходимо вести в этих условиях.

2. Разработана методика определения тиомочевины в реакции образования 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с применением КР-спектроскопии *in situ*.

3. Разработана ТСХ методика разделения и определения геометрических изомеров 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, основанная на специфическом взаимодействии гидроксильных групп изомеров с модифицированной ацетатом кальция поверхностью пластины.

4. Разработан ТСХ способ разделения геометрических изомеров *N*,*N*'-диметил-4,5дигидроксиимидазолидин-2-тиона, основанный на специфическом взаимодействии гидроксильных групп *цис-N*,*N*'-диметил-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона с модифицированной ацетатом кальция поверхностью пластины.

5. Разработана ВЭЖХ методика определения тиомочевины, *цис-* и *транс-*4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона в реакции между тиомочевиной и глиоксалем с использованием ВЭЖХ.

6. Методом ЯМР-спектроскопии установлено, что побочными продуктами получения 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона, являются: 1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тион, *цис- и транс*-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-он.

7. Предложен способ определения структур имидазолидин-2-онов, -2-тионов и имидазолидинов с использованием значения ДИС.

8. Предложена схема реакций, объясняющая образование побочных продуктов в синтезе 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона. Предложенная схема согласуется с результатами, полученными другими методами (ВЭЖХ, ЯМР).

Список сокращений и условных обозначений

а.е.м – атомная единица массы;

АЭС – атомно-эмиссионная спектроскопия;

А(тиол./тион.) – отношение оптических плотностей тиольной к тионной форме тиомочевины;

ВНФ – водная нормальная фаза;

ВНФХ – водная нормально-фазовая хроматография;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВЭЖХ-МС- высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием;

ПТСХ-А-В-УФ– пластины для тонкослойной хроматографии на алюминиевой подложке, высокоэффективные с ультрафиолетовым детектированием;

ГО – глиоксаль;

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием;

ДГИ – 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-он;

ДГИТ-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тион;

ДиМеДГИТ – диметил-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тион;

ДиМеТМ-*N*,*N*'-диметилтиомочевина;

ДИС – значение изотопных сдвигов дейтерия;

ДиФДГИТ- дифенил-4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тион;

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия;

КР-спектроскопия – спектроскопия комбинационного рассеяния;

м.д. – миллионная доля;

НФ ВЭЖХ – нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;

ПКО – предел количественного определения;

ПО – предел обнаружения;

СКО- среднеквадратичное отклонение;

ТМ – тиомочевина;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

Список использованной литературы

 Nelyubina, Yu. V. The synthesis, structure, and electron density distribution in crystals of 4,5dihydroxyimidazolidine-2-thiones / Yu.V. Nelyubina, G.A. Gazieva, V.V. Baranov, P.A. Belyakov, A.O. Chizhov, K.A. Lyssenko, A. N. Kravchenko // Russ. Chem. Bull., Int. Ed. – 2009. – V. 58. – № 7. – P. 1353–1360. DOI: 10.1007/s11172-009-0181-5.

2. Singh, M. The Synthetic Challenge of Thioglycolurils / M. Singh, G. Parvari, M. Botoshansky,
E. Keinan, O. Reany // Eur. J. Org. Chem. – 2014. – V. 5. –№ 2. – P. 933–940. DOI: 10.1002/ejoc.201301672.

3. Schiessl, W.C. Experimental and Theoretical Approaches to the Protonation of Thiourea: A Convenient Nucleophile in Coordination Chemistry Revisited / W.C. Schiessl, N.K. Summa, C.F. Weber, S. Gubo, C. Dücker-Benfer, R. Puchta, N. J. R. van Eikema Hommes, R. van Eldik // Z. anorg. allg. Chem.– 2005. – V. 631. –№ 12. – P. 2812–2819. DOI: 10.1002/zaac.200500157.

4. Pang, S. Solvent-dependent dynamics of hydrogen bonding structure 5-(methylthio)-1,3,4thiadiazole-2(3H)-thione as determined by Raman spectroscopy and theoretical calculation / S. Pang, Y. Zhao, X. Liu, J. Xue, X. Zheng // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2017. –V. 171. – P. 470–477. DOI: 10.1016/j.saa.2016.08.023.

5. Witanowski, M. Nitrogen NMR shieldings of thiourea systems as a function of solvent polarity and hydrogen bond effects/ M. Witanowskia, Z. Biedrzyckaa, W. Sicinskaa, G.A. Webb // Journal of Molecular Structure – 2000. – V. 516. – № 2. – 3. – P. 107–112. DOI:10.1016/S0022–2860(99)00202–1.

6 Allgretti, P.E. Study of the Occurrence of Tautomeric Forms of Ureas and Thioureas by Mass Spectrometry / P.E. Allgretti, V. Peroncini, E.A. Castro // J. Furlong // Int. J. Chem. Sci. – 2003. – V. 1. – № 1.– P. 1–12.

7. Ragamathunnisa, M. Spectroscopic study on thiourea and thiosemicarbazide in non-aqueous media / M. Ragamathunnisa, E.J. Vasantha Rani, R. Padmavathy, N. Radha // Journal of Applied Physics. – 2013. – V. 4. – № 1. – P. 5–8.

8. Dimova, V. UV spectrophotometric determination of pK's of 1,2,4-triazoline-3-thiones in sodium hydroxide solutions / V. Dimova, I. Jordanov, L. Dimitrov // Journal of the Chilean Chemical Society. – 2016. – V. 61.– № 3. – P. 3071–3075. DOI: 10.4067/S0717–97072016000300013.

9. Mullen, D. Refinement of the structure of thiourea: A neutron diffraction study at 293 K / D. Mullen, G. Heger, W. Treutmann // Zeitschrift für Kristallographie – 1978. – V. 148. – № 1–2. – P. 95–100.

10. Kravchenko, A.N. Diastereoselective synthesis of 4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ones (-thiones) and their structure / A.N. Kravchenko, V.V. Baranov, Yu.V. Nelyubina, G.A. Gazieva, I.V.

Svitan'ko // Russian Chemical Bulletin, International Edition – 2012. – V. 61. – № 1. – P. 64–73. DOI: 10.1007/s11172-012-0010-0.

11. Zhang, Z.F. Trans-4,5-dihydroxyimidazolidine-2-thione / Z.F. Zhang, J.M. Zhang, J.P. Guo, G.R. Qu // Acta. Cryst. – 2007. – V. 63. – P. 2821–2823. DOI:10.1107/S1600536807018429.

12. Pıhtılı, G. Classical and microwave-assisted synthesis of substituted-dihydroxyimidazolidine-2-thiones compounds / G. Pıhtılı, H.Tuncer // J. Biol. & Chem. – 2017. – V. 45. – № 2. – P. 163–174. DOI.10.15671/HJBC.2017.149.

13. Chen, X. Monitor polyimide production from diamine and dianhydride reactions using a combination of in situ infrared and Raman spectroscopy / X. Chen, Q.M. Wang, L. Bu // J. Appl. Spectroscopy. – 2017. – V. 71. – № 9. – P. 2128–2135. DOI:10.1177/0003702817700427.

14. Chen, X. In situ monitoring of emulsion polymerization by Raman spectroscopy: A robust and versatile chemometric analysis method. / X. Chen, K. Laughlin, J. R. Sparks, L. Linder, V. Farozic, H. Masser, M. Petr // Organic Process Research & Development. – 2015. – V. 19. – № 8. – P. 995–1003. DOI: 10.1021/acs.oprd.5b00045.

15. Aarnoutse, P.J. Quantitative Raman reaction monitoring using the solvent as internal standard / P.J. Aarnoutse, J.A. Westerhuis // Anal. Chem. – 2005 – V. 77. – № 5. – P. 1228–1236. DOI: 10.1021/ac0401523.

16. Chen, X. In situ monitoring of heterogeneous hydrosilylation reactions using infrared and Raman spectroscopy: normalization by phase-specific internal standards / X. Chen, Y. Cheng, M. Matsuba, X. Wang, S. Han, J. Mowbray, Q. Zhu, // J. Appl. Spectroscopy – 2019. – V. 73. – № 11. – P. 1299–1307. DOI: 10.1177/0003702819858916.

17. Broan, J.C. Mechanistic studies in the chemistry of thiourea. Part 2. Reaction with benzil in acid solution / J.C. Broan, A. R. Butler // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. – 1991. – V. 2 – P. 1501–1504. DOI: 10.1039/P29890000731.

18. Panahi, H. Specific interaction of boric acid with carbohydrates and its effect on thin layer chromatography / H. Panahi, E. Moniri, I. Elham, A. Izadi, F. Abolhasani, E. Abutorabi, L. Abedini, S. Almasi, A. Akbarzadeh // J. Appl. Chem. – 2009. – V. 9. – P. 52–58.

19. Bhushan, R. TLC separation of some common sugars on silica gel plates impregnated with transition – metal ions / R. Bhushan, S. Kaur // Biomed Chromatogr. – 1997. – V. 11. – N $^{\circ}$ 1. – P. 59–60. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0801(199701)11:1<59::AID-BMC632>3.0.CO;2-Q.

20. Flieger, J. Optimizing modification conditions of silics gel with metal salts / J. Flieger, H.
Szumilo, K. Gielzak-Koćwin // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. – 1999. –
V. 22. – № 19. – P. 2879–2894. DOI: 10.1081/JLC-100102065.

21. Sadek, P.C. The investigation of the influence of trace metals in chromatographic retention processes / P.C. Sadek, C. J. Koester, L. D. Bowers // J. Chromatogr. Sci. – V. 25. – № 11. – P. 489–493. DOI: 10.1093/chromsci/25.11.489.

22. Bhushan, R. Different approaches of impregnation for resolution of enantiomers of atenolol, propranolol and salbutamol using Cu (II)-l-amino acid complexes for ligandexchange on commercial thin layer chromatographic plates / R. Bhushan, S. Tanwar // Journal of Chromatography A. – 2010. – V. 1217. – P. 1395–1398. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.071.

23. Gopinath, S. Thermal and dielectric studies on bis (Thiourea) Nickel Chloride NLO single crystals /S. Gopinath, S. Barathan, R. Rajasekaran // J. Therm. Anal. Calorim. – 2012. – V. 109. – P. 841–845.

24. Ramanan, M. Crystal growth and characterization of a new semi organic non-Linear optical urea magnesium sulphate single crystals by solution growth slow evaporation method / M. Ramanan, R. Radhakrishnan, S. Krishnan, V. Chithambaram// Ittyachen, Mater. Lett. – 2013. – №. 2 – P. 33–38.

25. Selvaraju, K. A new metal-organic crystal: Potassium thiourea chloride / K. Selvaraju, R. Valluvan, S.A. Kumara // Mater. Lett. – 2007. – V. 61. – № 3. – P. 751–753. DOI: 10.1016/j.matlet.2006.05.054.

26. Kirupavathy, S. Investigations on the growth and characterization studies of cadmium thiourea acetate (CTA) single crystals / S. Kirupavathy, S. Mary, P. Srinivasan, N. Vijayan, G. Bhagavannarayana, R. Gopalakrishnan // J. Cryst. Growth. – 2007. – V. 306. – P. 102–110. DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2007.03.036.

27. Pabitha, G. Investigation on the linear and nonlinear optical properties of a metal organic complex Bis thiourea zinc acetate single crystal / G. Pabitha, R. Dhanasekaran // Opt. Laser. Technol. – 2013. – V. 50. – P. 150–154.

28. Rajasekaran, R. Synthesis, Growth and characterization of glycine ammonium bromide: A potential NLO material / R. Rajasekaran, P.M. Ushasree, R. Jayavel, P. Ramasamy // J. Cryst. Growth. – 2001. – V. 299. – P. 563–567. DOI: 10.1016/j.matpr.2019.02.119.

29. Ramamurthi, K. The growth and characterization of a metal organic crystal, potassium thiourea thiocyanide /K. Ramamurthi, G. Madhurambal, B. Ravindran, M. Mariappan, S.C. Mojumdar, // J. Therm. Anal. Calorim. – 2011. – V. 104. – P. 943–947. DOI: 10.1007/s10973-011-1492-y.

30. Hanumantharao, R. Growth and characterization of semi-organic nonlinear optical crystal / R. Hanumantharao, S. Kalainathan // J. Therm. Anal. Calorim. – 2013. – V. 114. – P. 239–243. DOI: 10.1007/s10973-012-2925-y.

31. Rosenheim, A.R. Über die thiokarbamidverbindungen rweiwertiger metallsalze / A.R. Rosenheim, V. J. Meyer // Z. anorg. allg. Chem. – 1906. – V. 49. – № 13. – P.13–27.

32 E. M. Tulupa, E. Ya. Baybarova, V.V. Movchan // Koordinatsionnaya khimiya. – 1988. – V.
6. – № 3. – 348–354.

33. Пат.US9944769, МПКС08К5/21. Urea-derived products and methods for making same /Thomas J.B.; заявительипатентообладательProcter and Gamble Co. – N 20140117274A1; заявл. 26.10.12; опубл. 01.05.14. – 8с.

34. Muynck, C. Boric acid as a mobile phase additive for high performance liquid chromatography separation of ribose, arabinose and ribulose/ C. Muynck, J. Beauprez, W. Soetaert, E. J. Vandamme //J. Chromatogr. A. – 2006. – V. 1101. – P. 115–121.

35. Herbreteau, B. Review and state of sugar analysis by high performance liquid chromatography // Analusis. -1992. - V. 20. - N = 3. - P. 355-374.

36. Vente, J. Comparison of sorption isotherms of mono- and disaccharides relevant to oligosaccharide separations for Na, K, And Ca loaded cation exchange resins / J. Vente, H. Bosch, A.°Haan, P. Bussmann // Chem. Eng. Commun. – 2005. – V. 192. – P. 23–33. DOI: 10.1080/00986440590473254.

37. Stefansson, M Ligand-exchange chromatography of carbohydrates and glycoconjugates / M. Stefansson, D. Westerlund // J. Chromatogr. A. – 1996. – V. 720. – № 1. – P. 127–136. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00276-6.

38. Angyal, S.J. Complexes of carbohydrates with metal cations. XIX – the effect of the size of the cation and of the interoxygen distances // Aust. J. Chem. – 2000. - V. 53. - P. 567-570.

39. Tiihonen, J. Modelling the sorption of water–ethanol mixtures in cross-linked ionic and neutral polymers / J. Tiihonen, I. Markkanen, E. Paatero // Chem. Eng. Commun. – 2002. – V. 57 – № 11. – P. 1885–1897. DOI: 10.1016/S0009-2509(02)00097-0.

40. Tani, K. Retention behavior of monosaccharides and disaccharides on titania / K. Tani, M. Kitada, M. Tachibana, H. Koizumi, T. Kiba // Chromatographia. – 2003. – V. 57.– P. 409–412. DOI: 10.1007/BF02492416.

41. Zhang, M.C. Catalytic asymmetric synthesis of chiral thiohydantoins via the domino cyclization reaction of β , γ -unsaturated α -ketoesters and *N*,*N*'-dialkylthiourea / M.C. Zhang, D.C. Wang, G.R. Qu, H.M. Guo //Org. Chem. Front. – 2022. – V. 9. – P. 4358–4364. DOI:10.1039/D2Q000669C.

42. Calla, D. Thiourea determination for the precious metals leaching process by iodate titration /D. Calla, F. Nava-Alonso // Rev. Mex. Ing. Quim. – 2020. – V. 19. – P. 275–284. DOI: 10.24275/rmiq/IA539.

43. Bowley, H.J. Quantitative determination of thiourea in aqueous solution in the presence of sulphur dioxide by Raman spectroscopy / H.J. Bowley, E.A. Crathorne, D.L. Gerrard // Analyst. – 1986. – V. 111. – P. 539–542. DOI:10.1039/AN9861100539.

44. Kargosha, K. Vapour phase fourier transform infrared spectrometric determination of thiourea / K. Kargosha, M. Khanmohammadi, M. Ghadiri // The Analyst. – 2001. – V. 126. – № 8. – P. 432–1435. DOI: 10.1039/b102354n.

45. Kargosha, K. Fourier transform infrared spectrometric determination of thiourea in the presence of sulphur dioxide in aqueous solution / K. Kargosha, M. Khanmohammadi, M. Ghadiri // Analytica Chimica Acta. – 2001. – V. 437. – №1. – P. 139–143. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)00943-6.

46. Raffaelli, A. Rapid determination of thiourea in waste water by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry using selected-reaction / A. Raffaelli, S. Pucci, R. Lazzaroni, P. Salvadori // Monitoring rapid communications in mass spectrometry. – 1997. – V. 11. –№ 3. – P. 259–264. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(19970215)11:3<259::AID-RCM826>3.0.CO;2-%23.

47. Abdulkadir, L. Electrooxidation of thiourea and its square-wave voltammetric determination using pencil graphite electrode / L. Abdulkadir, K. Ertuğrul, Y. Yavuz // Reviews in Analytical Chemistry. – 2011. – V. 30. – № 1. P. 45–51. DOI:10.1515/revac.2011.005.

48. Polta, T. Z. Pulsed amperometric detection of sulfur compounds: Part I. Initial studies of platinum electrodes in alkaline solutions / T. Z. Polta, D. C. Johnson // Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. – 1986. – V. 209. – № 1. – P. 159–169. DOI:10.1016/0022-0728(86)80194-2.

49. Rafiee, M. Catalytic oxidation of thiourea at alumina modified Pt electrode / M. Rafiee, D. Nematollahi // Sensors. – 2003. – V. 3. –№ 11. – P. 534–543. DOI:10.3390/s31100534.

50. Акенеев, Ю.А. Определение тиомочевины в сернокислых растворах электролитического рафинирования меди методом анодной вольтамперометрии / Ю. А. Акенеев // Технология органических веществ и высокомолекулярных соединений материалы региональной научно-практической конференции, Томск, 8–10 октября 2003 г.: / Администрация Томской области; Томский политехнический университет. Кафедра технологии основного органического синтеза. – Томск: Изд-во ТПУ,2003. – С. 1310.

51. Spataru, N. Voltammetric determination of thiourea at conductive diamond electrodes / N. Spataru, T. Spataru, A. Fujishima // Electroanalysis. – 2005. – V. 17. – P. 800–805. DOI: 10.1002/elan.200403139.

52. Manea, F. Amperometric determination of thiourea in alkaline media on a copper oxide – copper electrode / F. Manea, C. Radovan, J. Schoonman // Journal of Applied Electrochemistry. – 2006.
– V. 36. – P. 1075–1081. DOI: 10.1007/s10800-006-9152-9.

53. Smyth, M.R. Determination of some thiourea-containing pesticides by pulse voltammetric methods of analysis / M.R. Smyth, J.G. Osteryoung // Anal Chem. – 1977. – V. 49. – № 14. – P. 2310–2314. DOI: 10.1021/ac50022a050. PMID: 931083.

54. Stará, V. Adsorptive stripping voltammetric determination of thiourea and thiourea derivatives / V. Stará, M. Kopanica // Analytica Chimica Acta. – 1984. – V. 159. – P. 105–110. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)84286-5.

55. Berge, H. Voltammetrische anreicherung und bestimmung sehr geringer substanzmengen am hängenden quecksilbertropfen unter bildung schwerlöslicher verbindungen mit dem elektrodenmaterial / H. Berge, P. Jerochewski // Z. Anal. Chem. – 1965. – V. 212. – P. 278–286. DOI: 10.1007/BF00519978.

56. Abbasia, S. Determination of thiourea in fruit juice by a kinetic spectrophotometric method / S. Abbasia, H. Khania, L. Hosseinzadeha, Z. Safari // Journal of Hazardous Materials. – 2010. – V. 174. – P. 257–262. DOI:10.1016/j.jhazmat.2009.09.045.

57. Chamjangali, M. A. An on-line spectrophotometric determination of trace amounts of thiourea in tap water, orange juice, and orange peel samples using multi-channel flow injection analysis/ M. A. Chamjangali, N. Goudarzi, A. G. Moghadam, A.H. Amin // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. – V. 149. – P. 580–587. DOI: 10.1016/j.saa.2015.04.110.

58. Tavallali, H. A novel and simple naphthol azo dye chemosensor as a naked eye detection tool for highly selective, sensitive and accurate determination of thiourea in tap water, juices and fruit skins / H. Tavallali, A. Parhami, S. R. Dastghaib, M. A. Karimi // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2023. – V. 289. – P. 122-194. DOI: 10.1016/j.saa.2022.

59. Hosoya, H. Ultraviolet absorption spectra of aqueous solutions and single crystals of thioacetamide and thiourea / H. Hosoya, J. Tanaka, S. Nagakura // Bulletin of the Chemical Society of Japan. – 1959. – V. 33. – №. 6. – P. 850–860. DOI: 10.1246/bcsj.33.850.

60. Schiessl, W. Experimental and theoretical approaches to the protonation of thiourea: a convenient nucleophile in coordination chemistry / W. Schiessl, N. Summa, C. Webera, S. Gubo, C. Dücker-Benfera, R. Puchta, N. Eikema Hommes, R. Eldika // Zeitschriftfür anorganische und allgemeine Chemie. – 2005. – V. 116. – №. 631. – P. 2812–2819. DOI: 10.1002/zaac.200500157.

61. Kalichkina, L.E. Spectral study of thione-thiol tautomerization of thiourea in aqueous alcohol solution / L.E. Kalichkina, A.A. Bakibaev, V.S. Malkov // Bulletin of the University of Karaganda – Chemistry. – 2020. – V. 99.– № 3. – P. 66–71. DOI: 10.31489/2020Ch3/66-71.

62. Loo, B.H. Molecular orientation of thiourea chemisorbed on copper and silver surfaces // Chem. Phys. Lett. – 1982. – V. 89. – № 4. – P. 346–350. DOI:10.1016/0009-2614(82)83513-6.

63. Macomber, S.H. Surface-enhanced raman scattering magnified by photochemical activation of the silver electrode in aqueous halide electrolytes / S.H. Macomber, T.E. Furtak, T.M. Devine // Chem. Phys. Lett. – 1982. – V. 90. – № 6. – P. 439–444. DOI: 10.1016/0009-2614(82)80251-0.

64. Yamaguchi, A. Infrared absorption spectra of inorganic coordination complexes. XIV. infrared studies of some metal thiourea complexes / A. Yamaguchi, R.B. Penland, S. Mizushima, T.J. Lane, C. Curran, J.V. Quagliano // Am. Chem. Soc. – 1958. – V. 80. – № 3. – P. 527–529. DOI: 10.1021/ja01536a005.

65. Dollish, F.R. In characteristic Raman frequencies of organic compounds / F.R. Dollish, W.G. Fateley, F.F. Bentley. – John Wiley: New York, 1974. – P.443.

66. Cao, P. Surface-Enhanced Raman scattering spectra of thiourea adsorbed at an iron electrode in NaClO₄ solution/ P. Cao, J. Yao, B. Ren, R. Gu, Z. Tian, // The Journal of Physical Chemistry B. – 2002. – V. 106. – № 39. – P. 10150–10156. DOI: 10.1021/jp0257395.

67. Su, Y.Q. Density functional theory calculations of the influence of weak hydrogen bonding interactions on the Raman spectra of thiourea in aqueous solution / Y.Q. Su, D.Y. Wu, Z.Q. Tian // Acta Phys. – Chim. Sin. – 2014. – V. 30. – № 11. – P. 1993–1999. DOI: 10.3866/PKU.WHXB201409011.

68. Okuno, M. Hyper Raman spectroscopy of alcohols excited at 532 nm: methanol, ethanol, 1propanol, and 2-propanol // J. Raman Spectrosc. – 2021. – V. 52. – № 4. –P. 849–856. DOI: 10. 1002/jrs.6066.

69. Emin, A. Raman study of mixed solutions of methanol and ethanol / A. Emin, A. Hushur, T. Mamtimin // AIP Advances. – 2020. – V. 10. – № 6. –Art. num. 6. DOI: 10.1063/1.5140722.

70. Brennan, N. Structural studies of thallium(I)-thiourea complexes / N. Brennan // Copyright by University of Pretoria. – 2005. – P. 88–108.

71. Zhang, H. Resonance Raman spectroscopic and theoretical study of geometry distortion of thiourea in 21A state / H. Zhang, Y. Zhao, X. Zheng // Chin. J. Chem. Phys. – 2012. – V. 25. – № 1. – P. 1–10. DOI: 10.1088/1674–0068/25/01/1–10.

72. Avzianova, E. Raman spectroscopy of glyoxal oligomers in aqueous solutions / E. Avzianova, S. D. Brooks // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2013. – V. 101. – № 15. – P. 40–48. DOI: 10.1016/j.saa.2012.09.050.

73. Pelletier, M.J. Quantitative analysis using Raman spectrometry. // Applied Spectroscopy. – 2003. – V. 57. – № 1. – P. 20A–42A. DOI: 10.1366/000370203321165133.

74. Пат.US6977729B2, МПК G01N21/8507.Optical immersion probe incorporating a spherical lens / Marquardt B.J.; заявитель и патентообладатель: University of Washington. – N 20040165183A1; заявл. 24.02.04; опубл. 20.12.05. – 19 с.

75. Coelho, J. Development and Characterization of Lanthanides Doped Hydroxyapatite Composites for Bone Tissue Application / J. Coelho, N.S. Hussain, P.S. Gomes, M.P. Garcia, M.A. Lopes, M.H. Fernandes, J.D. Santos – Portugal: Bentham Science Publishers, 2012. Ch.1. – P. 87–115. DOI: 10.2174/9781608054527113010008. 76. Xiao, H. Quantitative Raman spectral measurements using a diamond-coated all-silica fiberoptic probe / H. Xiao, S. Dai, J.P. Young, C.S. Feigerle, A.G. Edwards // Applied Spectroscopy. – 1998. – V. 52. – № 4. – P. 626. – 628. DOI:10.1366/0003702981943987.

77. Zheng, J. Diamond for fiber-optic Raman spectroscopy: doctor of philosophy (PhD) dissertation: Electrical & Computer Engineering / Zheng Jianli. – Old Dominion University, 1997. – P. 143. DOI: 10.25777/3mpc-wq26.

78 Zheng, X. Self-referencing Raman probes for quantitative analysis / X. Zheng, W. Fu, S. Albin, K. L. Wise, A. Javey, J. B. Cooper //Applied Spectroscopy. – 2001.– V. 55.– № 4. – P. 382–388. DOI: 10.1366/0003702011952046.

79. РМГ 61-2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – Взамен РМГ 61-2003; введ.2012-09-01.
– М.: Стандартинформ, 2012. – 59 с. – (Государственная система обеспечения единства измерений).

80. Kalichkina, L.E. The study of structural features of N- and O-derivatives of 4,5dihydroxyimidazolidine-2-thione by NMR spectroscopy and quantum-chemical calculations / L.E. Kalichkina, A.V. Fateev, P.K. Krivolapenko, K.A. Isakova, A.S. Knyazev, V.S. Malkov, A.A. Bakibaev, V.P. Tuguldurova // Magnetochemistry. – 2023. – V. 9. – № 1. – Art. num. 15. DOI: 10.3390/magnetochemistry9010015.

81. Fiala, T. Thermodynamics of halide binding to a neutral bambusuril in water and organic
Solvents / T. Fiala, K. Sleziakova, K. Marsalek, K. Salvadori, V. Sindelar // J. Org. Chem. – 2018. – V.
83. – № 4. – P. 1903–1912. DOI: 10.1021/acs.joc.7b02846.

82. Correia, H.D. Easy synthesis of *trans*-4,5-dihydroxy-2-imidazolidinone and 2,4-dimethylglycoluril / H. D. Correia, R. S. Cicolani, R. F. Moral,G. J. F. Demets // Synthesis. – 2016. –
V. 48. – № 2. – P.210–212. DOI: 10.1055/s-0035-1560831.

83. Vail, S.L. Formation and Identification of cis- and trans-Dihydroxyimidazolidinones from Ureas and Glyoxal / S.L. Vail, R.H. Barker, G.P. Mennitt // J. Org. Chem. – 1965. – V. 30. – № 7. – P. 2179–2182. DOI: 10.1021/jo01018a015.

84. Trzhtsinskaya, B. V. Imidazole-2-thiones: synthesis, structure, properties / B.V. Trzhtsinskaya, N.D. Abramova // Sulfur Reports. – 1991. – V. 10. – № 4. –P. 389–421. DOI: 10.1080/01961779108048760.

85. Dai, C. Electrochemical production of lactic acid from glycerol oxidation catalyzed by Au Pt nanoparticles /C. Dai, L. Sun, H. Liao, B. Khezri, R. D. Webster, A. C. Fisher, Z. J. Xu, // J. Catal. – 2017. – V. 356. – P. 14–21. DOI:10.1016/j.jcat.2017.10.010.

86. Tassoti, S. Solvent-independent determination of heteroatom protonation states from NMR spectra by differential deuterium isotope shifts / S. Tassoti, M. Walenta, A. Pöcheim, K. Buchberger, O. Kunert, K. Zangger // Analyst. – 2019. – V. 144. – № 24. – P. 7463–7467. DOI: 10.1039/C9AN01364D.

87. Пат. RU 2580289 Российская Федерация, МПК С07D233/00. Способ анализа 4,5-Каличкина Л.Е., Никулина A.E. дигидроксимидазолин-2-тиона / Мальков B.C.; патентообладатель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» - заявл. 27.05.2015; опубл. 10.04.2016.

88. Варфаломеева, В.В. Слабые водородные связи при адсорбции нежёстких молекул на графитированной термической саже / В.В. Варфаломеева, А.В. Терентьев // Журнал структурной химии. – 2017. – Т. 58. – № 3. – С. 586–613.

89. Baker, J.O. Separation of sugar anomers by aqueous chromatography on calcium- and leadform ion-exchange columns: Application to anomeric analysis of enzyme reaction products / J.O. Baker, M.E. Himmel // Journal of Chromatography A. – 1986. – V. 357. – P. 161–181. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95818-2.

90. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии: пер. со словацкого, в 2-х частях / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – М.: Мир, 1980. Ч.1. – 1980. – 295 с.

91. Сильверстейн, Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Ф. Вебстер, Д. Кимл; пер. с англ. Н. М. Сергеева, Б. Н. Тарасевича. – Москва: БИНОМ. Лаб. знаний, 2011. – 557 с.

92. Mamko, K. Separation of cis/trans isomers of 4,5-dihydroxyimidazolidine-2-thione and its dimethoxy-derivative by aqueous normal-phase HPLC mode / K. Mamko, L. Kalichkina, O. Kotelnikov, A. Nikulina, N. Dementeva, D. Novikov // Chromatographya. – 2020. – V. 83. – № 9. – P. 1087–1093. DOI: 10.1007/s10337-020-03926-8.

93. Greco, G. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations / G. Greco, T. Letzel // Journal of Chromatographic Science. – 2013. – V. 51. – № 7. – P. 684–693. DOI: 10.1093/chromsci/bmt015.

94. Jandera, P. Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants / P. Jandera, T. Hajek // J. Sep. Sci. – 2009. – V. 32. – № 21. – P. 3603–3619. DOI: 10.1002/jssc.200900344.

95. Pesek, J.J. Aqueous normal-phase chromatography using silica-hydride-based stationary phases / J.J. Pesek, T. Maria, M.T. Matyska, R.I. Boysen, Y. Yang, M.T.W. Hearn // J. TrAC. – 2013. – V. 42. – P. 64–73. DOI: 10.1016/j.trac.2012.09.016.

96. Kalichkina, L.E. Reaction Pathway and Kinetic Study of 4,5-Dihydroxyimidazolidine-2thione Synthesis by HPLC and NMR / L.E. Kalichkina, D.V. Novikov, O.A. Kotelnikov, V.S. Malkov, A.S. Knyazev // Heterocycles. – 2022. – V. 104. – № 11. – P. 1954–1965. DOI: 10.3987/COM-22-14731.

97. Broan, C.J. Mechanistic studies in the chemistry of thiourea. Part 2. Reaction with benzil in acid solution / C.J. Broan, A.R. Butler // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. – 1991. – V.10. – P. 1501–1504.

98. Nelder, J.A. A Simplex Method for function minimization / J.A. Nelder, R. Mead // Comput. J. – 1965. – V. 7. – № 7. – P. 308–313. DOI: 10.1093/comjnl/7.4.308.

99. Alshin, A. B. About one new two-stages Rosenbrock scheme for differential-algebraic systems / A. B. Alshin, E. A. Alshina // Math. Models Comput. Simul. – 2011. – V. 3. – № 5. – P. 604–618. DOI: 10.1134/S2070048211050024.

100. Alshina, E.A Diagnostics of singularities of exact solutions in computations with error control / E.A. Alshina, N.N. Kalitkin, P.V. Koryakin // Comput. Math. Math. Physics. – 2005. – V. 45. – № 10. – P. 1769–1779.

101. Никулина, А.Е. 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тион как ингибитор кислотной коррозии стали в соляно-кислых водных средах / А.Е. Никулина, Л.Е. Каличкина, Г.В. Лямина, О.В. Водянкина, В.С. Мальков // «Коррозия: Материалы и защита». – 2017. – № 7. – С. 18–22.

102. Пат. RU 2625312 Российская Федерация, МПК C23F11/16, C07D233/84. Способ получения ингибитора кислотной коррозии и способ его применения / Каличкина Л.Е., Никулина А.Е., Мальков В. С.; патентообладатель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Томский государственный университет– заявл. 11.08.2016; опубл. 13.07.2017.

103. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. Руководство Еврахим/Ситак / под ред. Л.А. Конопелько; пер. Р.Л. Кадиса. – Санкт-Петербург: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева. – 2002. – 149 с.

Приложение А

Расчет метрологических характеристик методик анализа проводили по пункту 5 РМГ 61 2010. Неопределенность, обусловленную приготовлением растворов, рассчитывали по руководству EBPAXИМ/СИТАК [103].

Расчет метрологических характеристик методики определения тиомочевины в реакционной массе с использованием КР-спектроскопии *in situ*

Концентрацию тиомочевины рассчитывали по уравнению градуировки: y=0,4067x + 0,6616.

Таблица А1 – Значения интенсивностей КР-полос при 730 и 790 см⁻¹ и рассчитанные по ним концентрации тиомочевины

	Стиомочевины=0.1(моль/л)				
	1 день	измерений			
730	790	I730/I790	Стиомочевины		
6506.2	9255.82	0.70	0.10		
6479.28	9206.24	0.70	0.10		
6480.13	9215.79	0.70	0.10		
6523.31	9220.62	0.71	0.11		
6520.48	9210.75	0.71	0.11		
	2 день	измерений			
6536.2	9285.82	0.70	0.10		
6565.9	9294.35	0.71	0.11		
6609.94	9354.25	0.71	0.11		
6576.13	9339.8	0.70	0.10		
6623.05	9390.05	0.71	0.11		
	3 день	измерений			
6476.78	9193.44	0.70	0.11		
6506.2	9255.82	0.70	0.10		
6503.28	9179.28	0.71	0.12		
6515.78	9197.57	0.71	0.12		
6527.92	9226.01	0.71	0.11		
	Стиомочеві	ины=0.2 (моль/л)			
	1 день	измерений			
6882.44	9328.08	0.74	0.19		
6963.49	9306.4	0.75	0.21		
6930.16	9304.72	0.74	0.20		
6904.36	9257.66	0.75	0.21		
6899.29	9255.96	0.75	0.21		
	2 день	измерений			
6886.96	9315.86	0.74	0.19		
6940.41	9288.45	0.75	0.21		

6879.02	9226.96	0.75	0.21
6847.06	9238.52	0.74	0.20
6884.31	9254.75	0.74	0.20
	3 день из	мерений	
6899.08	9201.22	0.75	0.22
6850.52	9206.45	0.74	0.20
6907.85	9235.4	0.75	0.21
6853.47	9176	0.75	0.21
6809.39	9162.31	0.74	0.20
	Стиомочевины	ы=0.3 (моль/л	
	1 день из	мерений	-
7270.96	9393.32	0.77	0.28
7281.97	9330.12	0.78	0.29
7335.98	9381.38	0.78	0.30
7303.18	9351.25	0.78	0.29
7357.88	9352.67	0.79	0.31
	2 день из	мерений	
7292.71	9337.96	0.78	0.29
7330.57	9293.14	0.79	0.31
7316.54	9328.06	0.78	0.30
7363.35	9347.53	0.79	0.31
7382.3	9381.92	0.79	0.31
	3 день из	мерений	
7292.71	9337.96	0.78	0.29
7330.57	9293.14	0.79	0.31
7316.54	9328.06	0.78	0.30
7363.35	9347.53	0.79	0.31
7382.3	9381.92	0.79	0.31
	Стиомочевины	і=0.49 (моль/ј	I)
	1 день из	мерений	
8213.8	9509.88	0.86	0.50
8130.9	9494.14	0.86	0.48
8065.58	9449.26	0.85	0.47
8116.42	9478.35	0.86	0.48
8074.77	9490.08	0.85	0.47
	2 день из	мерений	
8118.47	9393.72	0.86	0.50
8090.57	9384.98	0.86	0.49
8147.76	9419.77	0.86	0.50
8214.86	9468.84	0.87	0.51
8186.33	9423.66	0.87	0.51
	3 день из	мерений	
8245.05	9535.63	0.86	0.50
8244.24	9574.36	0.86	0.49
8201.9	9434.24	0.87	0.51
8132.42	9449.81	0.86	0.49

8141.76	9456.25	0.86	0.49
	Стиомочевины=	= 0.79 (моль /л	
	1 день изм	ерений	
9275.6	9509.88	0.98	0.77
9252.42	9494.14	0.97	0.77
9213.31	9438.28	0.98	0.77
9264.72	9455.96	0.98	0.78
9262.13	9451.9	0.98	0.78
	2 день изм	ерений	
9488.34	9474.29	1.00	0.84
9420.68	9485.37	0.99	0.82
9393.04	9510.64	0.99	0.80
9385.79	9515.31	0.99	0.80
9416.23	9502.72	0.99	0.81
	3 день изм	ерений	
9389.32	9545.58	0.98	0.79
9437.66	9525.86	0.99	0.81
9391.57	9489.4	0.99	0.81
9382.45	9495.93	0.99	0.80
9367.2	9499.8	0.99	0.80
	Стиомочевины=	= 1.08 (моль /л	
	1день изме	ерений	
10575.9	9650.9	1.10	1.07
10497.2	9576.58	1.10	1.07
10520.8	9611.45	1.09	1.06
10531	9618.13	1.09	1.07
10602.6	9641.41	1.10	1.08
	2день изм	ерений	
10721.8	9642.8	1.11	1.11
10741	9608.71	1.12	1.12
10691.6	9589.28	1.11	1.11
10653.6	9606.3	1.11	1.10
10638.4	9596.95	1.11	1.10
	3 день изм	ерений	
10655.1	9506.3	1.12	1.13
10620.2	9519.69	1.12	1.12
10571.3	9551.09	1.11	1.09
10664	9536	1.12	1.12
10585.4	9551.57	1.11	1.10
	Стиомочевины	=1.4 (моль/л	
	1 день изм	ерений	
11971.4	9749.96	1.23	1.39
12038.9	9741	1.24	1.41
11871.9	9684.91	1.23	1.39
11839.9	9695.31	1.22	1.38
11841.8	9697.9	1.22	1.38

2 день измерений				
12137.7	9622.22	1.26	1.47	
12315.7	9803.39	1.26	1.46	
12155.9	9719.43	1.25	1.45	
12153.5	9704.96	1.25	1.45	
12089	9793.82	1.23	1.41	
	3 день изм	ерений		
11960.9	9541.61	1.25	1.46	
12081.4	9571.09	1.26	1.48	
12053.6	9517.79	1.27	1.49	
12064.7	9523.22	1.27	1.49	
12024.1	9504.41	1.27	1.48	
Стиомочевины=1.57 (моль/л)				
1 день измерений				
12609.7	9653.88	1.31	1.58	
12585.6	9624.99	1.31	1.59	
12504.3	9649.18	1.30	1.56	
12550.9	9624.66	1.30	1.58	
12509.6	9634.41	1.30	1.57	
	2 день изм	ерений		
13086.4	9627.9	1.36	1.72	
12852.1	9594.02	1.34	1.67	
12804.8	9609.31	1.33	1.65	
12751.1	9610.41	1.33	1.64	
12731	9621.63	1.32	1.63	
	3 день изм	ерений		
12791.8	9593.79	1.33	1.65	
12810.2	9546.95	1.34	1.67	
12881.9	9513.08	1.35	1.70	
12826.5	9510.53	1.35	1.69	
12940.3	9517.13	1.36	1.72	

Таблица А2 – Метрологические характеристики методики определения тиомочевины с использованием КР-спектроскопии *in situ*, рассчитанные по п.5 РМГ 612010

Стиомочевины=0.1 моль/л				
Наименование	день 1	день 2	день 3	
	0.10	0.10	0.11	
	0.10	0.11	0.10	
	0.10	0.11	0.12	
	0.11	0.10	0.12	
	0.11	0.11	0.11	
ср. знач. в серии	0.11	0.11	0.11	
S (СКО в серии)	0.006	0.003	0.006	
отн. S(отн. СКО), %	5.6	2.9	5.6	
S^2	0.00004	0.00001	0.00004	

$(\sum S)^2$		0.000084		
$\max(\sum S)^2$		0.00004		
Gэксп.	0.456			
Gтабл	0.746			
Однородность дисперсий		да		
Показатель повторяемости мет	одикипо п	.5.2.1 РМГ 61 2010		
σ _г (СКО повторяемости методики), моль/л	0.01			
общее среднее		0.11		
σ _г (отн. СКО повторяемости методики), %		4.9		
СКО среднего арифметического		0,0017		
Показатель промежуточной прецизионности по п. 5.2.2 РМГ 61 2010				
σк(СКО промежуточной прецизионности),				
моль/л		0,0047		
σ _R (отн. СКО промежуточной прецизионности), %		4.3		
Определение систематической составляющей погрешностипо п.5.3 РМГ 61 2010				
Смешение, моль/л	_010	0.006		
отн. Смешение. %		6.0		
t эксп.	6.07			
t табл.	4.30			
	Смещение значимо на фоне случайного			
	разброса, поэтому в формуле расчета			
Смещение незначимо на фоне случайного	расширен	ной неопределенност	и учитываем	
разброса		смещение.		
Показатель правильности мет	одики по п	1.5.3 РМГ 61 2010		
иө (стандартная неопределенность.				
обусловленная смещением), моль/л		0.0062		
Uo (расширенная неопределенность,				
обусловленная приготовлением раствора,		0.0005		
МОЛЬ/Л		0.0005		
Об(расширенная неопределенность		0.012		
Иссотносители изд расширениед		0.012		
неопределенность) %		11 47		
Показатель точности метол	ики по п 5	<u>4 PMΓ 61 2010</u>		
ит (суммарная станлартная неопределенность)		0 0064		
моль/л		0.0001		
U _m (суммарная расширенная				
неопределенность), моль/л		0.013		
U _m (относительная суммарная расширенная				
неопределенность неопределенность), %		12.6		
Стиомочевинь	i=0.2 моль/	′л		
Наименование	день 1	день 2	день 3	
	0.19	0.19	0.22	
	0.21	0.21	0.20	
	0.20	0.21	0.21	
	0.21	0.20	0.21	

	0.21	0.20	0.20	
ср. знач. в серии	0.20	0.20	0.21	
S (СКО в серии)	0.010	0.008	0.007	
отн.Ѕ (отн. СКО), %	4.7	3.9	3.2	
S^2	0.00009	0.00006	0.00005	
$(\Sigma S)^2$		0.0002		
$\max(\Sigma S)^2$		0.00009		
Сэксп.		0.462		
Стабл		0.746		
Олноролность лисперсий		олноролны		
Показатель повторяемости мет	олики по п	5.2.1 PMΓ 61 2010		
от (СКО повторяемости метолики), моль/п		0.01		
общее среднее		0.20		
ог(отн СКО повторяемости метолики) %		4.0		
СКО среднего арифметического		0.0037		
	ИЛЦИЛСТИ Г	ол 5 2 2 РМГ 61 20	10	
ор (СКО промежуточной прецизионности)		10 11, 3,2,2 1 1011 01 20	10	
моль/л		0.0076		
σ _R (отн. СКО промежуточной прецизионности),	0.0070			
		3.7		
Определение систематической сост	авляющей	погрешности по п.5	.3	
РМГ 61	2010			
Смещение, моль/л	0.0045			
отн. Смещение, %		2.2		
t_эксп.		2.05		
t_табл.		4.30		
смещение незначимо на фоне случ. разброса		да		
Показатель правильности мет	одики по п	1.5.3 РМГ 61 2010		
иө (стандартная неопределенность.				
обусловленная смещением), моль/л		0.0022		
Uo (расширенная неопределенность,		0.0011		
обусловленная приготовлением раствора,				
МОЛЬ/Л				
Оө(расширенная неопределенность		0.0045		
Ис(относители изд расширениед		0.0043		
неопределенность) %		2 19		
Показатель точности метол	ики по п 5	<u>2.19</u> 4 PMΓ 61 2010		
показатсяв точности метод	ики по п.э.			
неопрелеленность).%		2.18		
U _m (суммарная расширенная		-		
неопределенность), моль/л		0.01		
U _m (относительная суммарная расширенная				
неопределенность неопределенность), %		4.4		
Стиомочевинь	I=0.3 моль/	′л		
Наименование	лень 1	лень 2	лень 3	
	0.28	0.29	0.29	
	0.29	0.31	0.31	

	0.20	0.20	0.20
	0.30	0.30	0.30
	0.29	0.31	0.31
	0.31	0.31	0.31
ср. знач. в серии	0.29	0.30	0.30
S (СКО в серии)	0.011	0.008	0.008
отн. S(отн. СКО), %	3.8	2.5	2.5
<u>S²</u>	0.00012	0.00006	0.00006
$(\sum S)^2$		0.000242814	
$\max(\sum S)^2$		0.000123874	
Gэксп.		0.510	
Gтабл		0.746	
Однородность дисперсий		да	
Показатель повторяемости мет	одики по п	.5.2.1 РМГ 61 2010	
σ _г (СКО повторяемости методики), моль/л		0.01	
общее срелнее		0.30	
от (относительное СКО повторяемости		0.00	
метолики). %		3.0	
СКО среднего арифметического	0.0066		
Показатель промежуточной прениз	Зионности по п. 5.2.2 РМГ 61 2010		
ор (СКО промежуточной пренизионности)			10
ок (сисо промежуто пюй прецизионности), моль/л		0 0099	
моль/л ор (относительное СКО промежуточной		0.0077	
прецизионности). %	3 3		
Определение систематической составляющей погрешности по п 5 3			
РМГ 61	2010	F	
Смешение, моль/л		0.00084	
Относительное смешение. %		0.3	
t эксп.		0.22	
t табл		4 30	
смещение незнанимо на фоне случайного		7.50	
pasonoca		Па	
Показатель правильности мет	ГОЛИКИ ПО П	5 3 PMT 61 2010	
обусловленная смешением), моль/л		0.0039	
Ио (расширенная неопределенность.			
обусловленная приготовлением раствора,			
моль/л		0.0016	
U_{Θ} (расширенная неопределенность			
обусловленная смещением), моль/л		0.0079	
U ₀ (относительная расширенная			
неопределенность), %		2.62	
Показатель точности метод	ики по п.5.	4 РМГ 61 2010	
u _m (суммарная стандартная неопределенность),			
		0.0077	
Um (суммарная расширенная			
неопределенность), моль/л		0.02	
Um (относительная суммарная расширенная			
неопределенность неопределенность), %		5.1	

Стиомочевины=0.49 моль/л				
Наименование	день 1	день 2	день 3	
	0.50	0.50	0.50	
	0.48	0.49	0.49	
	0.47	0.50	0.51	
	0.48	0.51	0.49	
	0.47	0.51	0.49	
ср знач в серии	0.48	0.51	0.50	
S (СКО в серии)	0.012	0.007	0.009	
	2.5	1.3	1.0	
s ²	2.5	0.00004	0.00000	
5 (E 0) ²	0.00014	0.00004	0.00009	
$(\sum S)^2$		0.00027		
$\max(\sum S)^2$		0.00014		
Бэксп .		0.521		
<u> </u>		0.746		
Однородность дисперсий		да		
Показатель повторяемости мет	одики по п	.5.2.1 РМГ 61 2010		
σr (СКО повторяемости методики), моль/л		0.01		
общее среднее	0.49			
σr (относительное СКО повторяемости				
методики), %	1.9			
СКО среднего арифметического	0.01201328			
Показатель промежуточной прецизионности по п. 5.2.2 РМГ 61 2010				
σ _R (СКО промежуточной прецизионности),				
моль/л		0.0143		
σ _R (относительное СКО промежуточной				
прецизионности), %		2.9		
Определение систематической сост РМГ 61	авляющей 2010	погрешности по п.5	.3	
	2010	0.0019		
		0.0019		
Относительное смещение, 70		0.4		
		0.28		
<u>t</u> таол.		4.30		
смещение незначимо на фоне случаиного		TO		
		да - 5 3 DMT 61 2010		
показатель правильности мет	одики по п	1.5.5 F WII 01 2010		
и (стандартная неопределенность.		0.007		
Ио (расширенная неопределенность		0.007		
обусловленная приготовлением раствора		0.003		
моль/п		0.005		
U ₀ (расширенная неопрелеленность				
обусловленная смещением), моль/л		0.014		
U ₀ (относительная расширенная				
неопределенность), %		2.89		
Показатель точности метод	ики по п.5.	4 РМГ 61 2010		
um (суммарная стандартная неопределенность),		0.014		
моль/л				

			1
О _т (суммарная расширенная неопрелеленность), моль/л		0.03	
Um (относительная суммарная расширенная	0.05		
неопрелеленность неопрелеленность). %	5.7		
Наимонородию		нош 2	пони 2
паименование			день 5
	0.77	0.84	0.79
	0.77	0.82	0.81
	0.77	0.80	0.81
	0.78	0.80	0.80
	0.78	0.81	0.80
ср. знач. в серии	0.78	0.81	0.80
S (СКО в серии)	0.006	0.015	0.007
отн. S(отн. СКО), %	0.8	1.8	0.9
S^2	0.00004	0.00022	0.00005
$(\sum S)^2$		0.00030	
$\max(\sum S)^2$		0.00022	
Бэксп.		0.711	
Gтабл		0.746	
Однородность дисперсий	да		
Показатель повторяемости методики по п.5.2.1 РМГ 61 2010			
σ _г (СКО повторяемости методики), моль/л	0.01		
общее среднее	0.80		
σ _г (относительное СКО повторяемости			
методики), %		1.3	
СКО среднего арифметического	o 0.019		
Показатель промежуточной прецизионности по п. 5.2.2 РМГ 61 2010			
σ _R (СКО промежуточной прецизионности), 0.02			
моль/л			
σ _R (относительное СКО промежуточной	2.6		
прецизионности), %			
Определение систематической сост РМГ 61	авляющей п 2010	огрешности по п.5	5.3
Смешение, моль/л	0.007		
Относительное смещение, %	0.8		
t эксп.	0.61		
t табл.	4.30		
смещение незначимо на фоне случайного			
разброса		да	
Показатель правильности методики по п.5.3 РМГ 61 2010			
u ₀ (стандартная неопределенность.		0.011	
обусловленная смещением), моль/л			
Uo (расширенная неопределенность,	0.0043		
обусловленная приготовлением раствора,			
моль/л			
U ₀ (расширенная неопределенность		0.022	
обусловленная смещением), моль/л			

U ₀ (относительная расширенная	2.78		
неопределенность), %			
Показатель точности метод	ики по п.5.4	РМГ 61 2010	
u _m (суммарная стандартная неопределенность),	0.022		
	0.04		
Um(суммарная расширенная		0.04	
И(относительная суммарная расширенная		5 5	
неопределенность неопределенность). %		5.5	
Стиомочевины	=1.08 моль/	Π	
Наименование	лень 1	лень 2	лень 3
пиниснование	1.07	1 11	1 13
	1.07	1.11	1.13
	1.07	1.12	1.12
	1.00	1.11	1.09
	1.07	1.10	1.12
	1.08	1.10	1.10
ср. знач. в серии	1.0/	1.11	1.11
S (СКО в серии)	0.005	0.010	0.015
отн. S(отн. СКО), %	0.5	0.9	1.4
<u>S²</u>	0.00002	0.00009	0.00023
$(\sum S)^2$	0.000350643		
$\max(\sum S)^2$	0.000230721		
Gэксп.	0.658		
Бтаб л	0.746		
Однородность дисперсий	да		
Показатель повторяемости методики по п.5.2.1 РМГ 61 2010			
σr (СКО повторяемости методики), моль/л	0.01		
общее среднее	1.10		
σ _r (относительное СКО повторяемости	1.0		
методики), %			
СКО среднего арифметического	0.024		
Показатель промежуточной прециз	ионности по	о п. 5.2.2 РМГ 61 20	10
$\sigma_{\rm R}$ (СКО промежуточной прецизионности),	1.10		
МОЛЬ/Л	1.18		
ок (относительное СКО промежуточной		4 20	
Прецизионности), 78	арланай	4.30	3
Определение систематической составляющей погрешности по п.5.5 РМГ 61 2010			
Смещение, моль/л		0.017	
Относительное смещение, %	1.5		
t эксп.	1.18		
t табл.	4.30		
смещение незначимо на фоне случайного			
разброса		да	
Показатель правильности методики по п.5.3 РМГ 61 2010			
uө (стандартная неопределенность.		0.014	
обусловленная смещением), моль/л			

Ио (расширенная неопределенность		0.006	
обусловленная приготовлением раствора	0.000		
		0.020	
обусловленная смешением) моль/л		0.029	
		2.61	
неопределенность) %		2.01	
		I РМГ 61 2 010	
		0.028	
ит (суммарная стандартная неопределенноств),		0.028	
		0.06	
$U_{\rm m}$ (Cymmaphas pacunpennas		0.00	
		5.2	
иеопределенность неопределенность) %		5.2	
неопределенность неопределенность), 70			
Стиомочевинь	1=1.4 моль/ ј	I	
Наименование	день 1	день 2	день 3
	1.39	1.47	1.46
	1.41	1.46	1.48
	1.39	1.45	1.49
	1.38	1.45	1.49
	1 38	1 41	1 48
ср. 2020 в серии	1.30	1.11	1.18
ср. знач. в серии S (СКО в серии)	0.015	0.025	0.014
	0.015	0.023	0.014
отн. S(отн. СКО), %	1.1	1./	0.9
<u> </u>	0.00022	0.00063	0.00018
$(\sum S)^2$	0.00103		
$\max(\sum S)^2$	0.00063		
Gэксп.	0.607		
Gтабл	0.746		
Однородность дисперсий	Да		
Показатель повторяемости мет	одики по п.:	5.2.1 РМГ 61 2010	
σ _г (СКО повторяемости методики), моль/д	0.02		
общее срелнее	1 44		
σ _г (относительное СКО повторяемости	1.77		
метолики). %	13		
СКО среднего арифметического	0.046		
Показатель промежуточной прециз	ионности п	о п. 5.2.2 РМГ 61 20	10
ов (СКО промежуточной прецизионности)			10
ок (сисе промежуте пон предизнопности), моль/л		0.048	
σв (относительное СКО промежуточной		01010	
прешизионности). %		3.4	
Определение систематической составляющей погрешности по п.5.3			.3
PMΓ 61 2010			
Смещение, моль/л		0.039	
Относительное смешение. %		2.8	
t aken		1 47	
t_экон.		/ 20	
ι_1aυ,		4.30	

Смещение незначимо на фоне случайного			
разброса		да	
Показатель правильности мет	одики по п.5	.3 РМГ 61 2010	
и _Ө (стандартная неопределенность.			
обусловленная смещением), моль/л		0.027	
Оо (расширенная неопределенность,			
обусловленная приготовлением раствора,		0.0075	
МОЛЬ/Л		0.0075	
Об (расширенная неопределенность		0.054	
		0.034	
иеопределенности) %		3 72	
Показатель тонности метол	ики по п 5 4	<u>Э.72</u> РМГ 61 2010	
ит (суммарная станлартная неопределенность)		0.053	
моль/л		0.035	
U _m (суммарная расширенная			
неопределенность), моль/л		0.11	
U _m (относительная суммарная расширенная			
неопределенность неопределенность), %		7.6	
Стиомочевины	=1.57 моль/л		
Наименование	день 1	день 2	день 3
	1.58	1.72	1.65
	1.59	1.67	1.67
	1.56	1.65	1.70
	1.58	1.64	1.69
	1.57	1.63	1.72
ср. знач. в серии	1.58	1.66	1.69
S (СКО в серии)	0.012	0.035	0.025
отн. S(отн. СКО). %	0.8	2.1	1.5
S^2	0.00015	0.00123	0.00064
$(\Sigma S)^2$	0.00012 0.00004		
$\max(\sum S)^2$	0.0020		
Сэксп	0.606		
Стаби	0.000		
Олноролность лисперсий		ла	
Показатель повторяемости мет	одики по п.5.	2.1 РМГ 61 2010	
σ _г (СКО повторяемости методики), моль/л	0.03		
общее среднее	1.64		
σ _r (относительное СКО повторяемости	емости		
методики), %	1.6		
СКО среднего арифметического 0.058			
Показатель промежуточной прецизионности по п. 5.2.2 РМГ 61 2010			10
σк (СКО промежуточной прецизионности),			
моль/л	0.06		
σ _R (относительное СКО промежуточной		2.7	
прецизионности), %		<u> </u>	2
Определение систематической составляющей погрешности по п.5.3 РМГ 61 2010			

Смещение, моль/л	0.070		
Относительное смещение, %	4.5		
t эксп.	2.11		
t_табл.	4.30		
Смещение незначимо на фоне случайного			
разброса	да		
Показатель правильности мет	годики по п.5.3 РМГ 61 2010		
uө (стандартная неопределенность.			
обусловленная смещением), моль/л	0.034		
Uo (расширенная неопределенность,			
обусловленная приготовлением раствора,			
моль/л	0.009		
U ₀ (расширенная неопределенность			
обусловленная смещением), моль/л	0.067		
U_{Θ} (относительная расширенная			
неопределенность), %	4.11		
Показатель точности методики по п.5.4 РМГ 61 2010			
u _m (суммарная стандартная неопределенность),	0.067		
моль/л			
Um (суммарная расширенная			
неопределенность), моль/л	0.13		
U _m (относительная суммарная расширенная			
неопределенность неопределенность), %	8.5		

Метрологические характеристики количественной ТСХ методики анализа транс-

4,5-дигидроксиимидазолидин-2-тиона в смеси с тиомочевиной и цис-ДГИТ

Определение концентрации ДГИТ проводили по уравнению градуировки: y = 855,04x + 836,09.

Таблица А3 – Значения яркости пятен на пластине и рассчитанные по ним концентрации*транс*-ДГИТ

С(ДГИТ)=0,3 мкг/на пластине			
1 день измерений			
Яркость	СДГИТ, мкг		
928	0.11		
945	0.13		
965	0.15		
933	0.11		
930	0.11		
2 день измерений			
1000	0.19		
980	0.17		
1025	0.22		
990.00	0.18		
1015.00	0.21		
3 день измерений			

940	0.12		
950	0.12		
946	0.13		
948.00	0.13		
968.00	0.15		
С(ЛГИТ)=0.6 м	0.15		
	мереций		
1492	0.77		
1524.6	0.81		
1550	0.83		
1481	0.75		
1500	0.78		
2 день изг	мерений		
1444	0.71		
1410	0.67		
1432	0.70		
1459	0.73		
1460	0.73		
3 день изг	мерений		
1398	0.66		
1350	0.60		
1400	0.66		
1410	0.67		
1405	0.67		
С(ДГИТ)=3 мкг/на пластине			
1 день изг	мерений		
3243	2.81		
3222.9	2.79		
3466	3.08		
3362	2.95		
2947	2.47		
2 день			
3580	3.21		
3100	2.65		
3198	2.76		
3262	2.84		
3234	2.80		
3 день			
3500	3.12		
3545	3.17		
3278	2.86		
3399	3.00		
3650	3.29		
С(ДГИТ)=4 мкг/на пластине			
1 день измерений			

1500	4.00		
4539	4.33		
4329.9	4.09		
4456	4.23		
4484	4.27		
4540	4.33		
2 день изм	ерений		
4350	4.11		
4300	4.05		
4238	3.98		
4200	3.93		
4204	3.94		
3 день изм	ерений		
4100	3.82		
3999	3.70		
4150	3.88		
4230	3.97		
4323	4.08		
С(ДГИТ)=4 мкг	/на пластине		
1 день измерений			
	•		
7463	7.75		
6684.5	6.84		
7920	8.28		
7804	8.15		
7674	8.00		
2 лень измерений			
6800	6.98		
7380	7.65		
7300	7.56		
7400	7.68		
7460	7.75		
3 день измерений			
7636	7.95		
7420	7.70		
7358	7.63		
7265			
1205	7.52		

Таблица А4 – Метрологические характеристики количественной ТСХ методики анализа транс-ДГИТ в смеси с тиомочевиной и цис-ДГИТ, рассчитанные по п.5 РМГ 612010

СДГИТ=0,3мкг/на пластине				
Наименование	день 1	день 2	день 3	
	0.11	0.19	0.12	
	0.13	0.17	0.13	
	0.15	0.22	0.13	
	0.11	0.18	0.13	
---	-------------------	----------------------------------	-----------------	--
	0.11	0.21	0.15	
ср. знач. в серии	0.12	0.19	0.13	
S (СКО в серии)	0.018	0.021	0.012	
отн. S(отн. СКО), %	14.7	11.0	9.2	
S^2	0.00032	0.00045	0.00015	
$(\Sigma S)^2$		0.000928746		
$\max(\sum S)^2$		0 000454798		
Gэксп		0.490		
Стабл		0.746		
		П9		
Показатон, новтор	амаети матаписи	да по п 5 2 1 РМГ 61 2	010	
показатель повторя	немости методики		.010	
σ _г (СКО повторяемости		0.02		
методики), мкг		0.15		
оощее среднее		0.13		
σ_r (отн. СКО повторяемости		11./		
		0.020		
СКО среднего арифметического	0	0.039	(1.2010	
Показатель промежуто	чнои прецизионнос	<u>сти по п. 5.2.2 РМІ</u>	61 2010	
σ_{R} (СКО промежуточной	0.041			
прецизионности), мкг	27.(
$\sigma_{\rm R}$ (отн. СКО промежуточнои	27.6			
прецизионности), %				
Определение систематической составляющей погрешности по п.5.3				
		50.1		
отн. смещение, %		6 71		
	4 30			
<u>t_</u> табл.		4.30		
1	Смещение знач	имо на фоне случа	йного разброса,	
смещение незначимо на фоне	поэтому в	формуле расчета ра	сширеннои	
случаиного разороса	неопредел	енности учитываем	смещение.	
Показатель прави	льности методики	по п.5.3 РМІ 61 20	10	
ие (стандартная неопределенность		0.022		
обусловленная смещением), мкг		0.045		
Оө(расширенная		0.045		
неопределенность обусловленная				
смещением), мкг		20.96		
Об(относительная расширенная		29.80		
неопределенность), 70				
Показатель точ	ности методики по	0.045		
ит (суммарнаястандартная	0.045			
еопределенность) мкг		0 09		
Um(относительная суммарная		0.07		
расширенная неопределенность				
неопределенность). %		29.8		
1 1 1 / 2				

СДГИТ=0,6 мкг/на пластине				
Наименование	день 1	день 2	день 3	
	0.77	0.71	0.66	
	0.81	0.67	0.60	
	0.83	0.70	0.66	
	0.75	0.73	0.67	
	0.78	0.73	0.67	
ср знач в серии	0.79	0.71	0.65	
S (СКО в серии)	0.032	0.024	0.028	
$\frac{S(CKO B CCPNI)}{S(CKO B CCPNI)}$	<u> </u>	3.4	<u> </u>	
S^2	0.00105	0.00059	0.00081	
$(\sum S)^2$	0.00105	0.00055	0.00001	
$(\sum S)^2$		0.0025		
$\frac{\max(\sum S)^2}{2}$		0.0011		
Gэксп.		0.429		
<u> </u>		0.746		
Однородность дисперсий		да		
Показатель повторя	емости методики і	<u>по п.5.2.1 РМГ 61 2</u>	010	
σr (СКО повторяемости		0.03		
методики), мкг		0.72		
общее среднее		0.72		
σ_r (отн. СКО повторяемости		4.0		
методики), %	0.000			
СКО среднего арифметического	<u>o</u> 0.069			
Показатель промежуточ	нои прецизионнос	<u>ти по п. 5.2.2 РМІ</u>	61 2010	
$\sigma_{\rm R}$ (CKO промежуточнои		0.073		
прецизионности), мкі	10.1			
ок(отн. СКО промежуточной	1011			
Определение системати	ческой состявляю	шей погрешности і	по п.5.3	
определение системати	РМГ 61 2010	iii iii iii iii iii iii iii iii iii ii	10 11.5.6	
Смещение, мкг		0.115		
отн. Смещение, %		19.2		
t эксп.		2.91		
t табл.		4.30		
смещение незначимо на фоне				
случайного разброса		да		
Показатель прави.	льности методики	по п.5.3 РМГ 61 20	10	
uө (стандартная		0.04		
неопределенность. обусловленная				
смещением), мкг				
U ₀ (расширенная		0.08		
неопределенность обусловленная				
смещением), мкг		11 1		
Ue(относительная расширенная	11.1			
неопределенность), %				
показатель точности методики по п.э.4 ГМП от 2010				
ит (суммарная стандартная		0.08		
псопределенность), мкі		0.00		

U _m (суммарная расширенная		0.16	
неопределенность), мкг	0.10		
U _m (относительная суммарная		26.4	
расширенная неопределенность			
неопределенность), %			
СД	ГИТ=3 мкг/на пла	стине	
Наименование	день 1	день 2	день 3
	2.81	3.21	3.12
	2.79	2.65	3.17
	3.08	2.76	2.86
	2.95	2.84	3.00
	2.47	2.80	3.29
ср. знач. в серии	2.82	2.85	3.09
S (СКО в серии)	0.228	0.212	0.166
OTH S(OTH CKO) %	8.1	7.4	5.4
²	0.052	0.045	0.028
$(\sum S)^2$	0.052	0 124	0.020
$\frac{(\sum S)}{\max(\sum S)^2}$		0.052	
		0.032	
Стоби		0.746	
Glaon		0.740	
Однородность дисперсии		да С 1 рыл (1 4	010
Показатель повторя	немости методики	по п.5.2.1 РМІ 61 2	2010
σ _г (СКО повторяемости		0.20	
методики), мкг	2 92		
оощее среднее		2.92	
σ_r (отн. СКО повторяемости		/.0	
	0.145		
СКО среднего арифметического	U.145 иной прецизионности по п. 5 2 2 РМГ 61 2010		
Показатель промежуто	чнои прецизионнос	<u>ти по п. 5.2.2 РМГ</u> 0.22	61 2010
ок (СКО промежуточной		0.22	
прецизионности), мкі	7.5		
ок(отн. СКО промежуточной	7.5		
Определение системати	ческой состявляю	шей погрешности	по п 5 3
	РМГ 61 2010	щен погрешности	10 11.5.0
Смещение, мкг		0.08	
отн. Смещение, %		2.70	
t эксп.		0.96	
t_табл.		4.30	
смещение незначимо на фоне			
случайного разброса		да	
Показатель прави	льности методики	по п.5.3 РМГ 61 20	10
иө (стандартная		0.083	
неопределенность. обусловленная			
смещением), мкг			
U ₀ (расширенная		0.167	
неопределенность обусловленная			
смещением), мкг			

U ₀ (относительная расширенная	5.72			
неопределенность), %				
Показатель точн	ности методики по	п.5.4 РМГ 61 2010		
u _m (суммарная стандартная				
неопределенность), мкг		0.167		
U _m (суммарная расширенная		0.33		
неопределенность), мкг		11.1		
U _m (относительная суммарная		11.1		
расширенная неопределенность				
неопределенность), 76				
СД	ГИТ=4 мкг/на плас	тине	-	
Наименование	день 1	день 2	день 3	
	4.33	4.11	3.82	
	4.09	4.05	3.70	
	4.23	3.98	3.88	
	4.27	3.93	3.97	
	4.33	3.94	4.08	
ср. знач. в серии	4.25	4.00	3.89	
S (СКО в серии)	0.101	0.076	0.145	
отн. S(отн. СКО), %	2.4	1.9	3.7	
S^2	0.01015	0.00578	0.02089	
$(\Sigma S)^2$		0.037		
$\max(\sum S)^2$	0.021			
Сэксп	0.567			
 Gтабл	0.746			
Однородность дисперсий	Да			
Показатель повторя	емости методики п	ю п.5.2.1 РМГ 61 2	010	
σ _r (СКО повторяемости		0.11		
методики), мкг				
общее среднее		4.05		
σr (отн. СКО повторяемости		2.7		
методики), %				
СКО среднего арифметического		0.185		
Показатель промежуточ	ной прецизионност	ги по п. 5.2.2 РМГ	61 2010	
σ _R (СКО промежуточной		0.21		
прецизионности), мкг				
σ_{R} (отн. СКО промежуточной		5.1		
прецизионности), %	U	U		
Определение систематической составляющей погрешности по п.5.3				
Смещение мит		0.046715		
		1.2		
		0.44		
t_3K011.		4 30		
		יניד		
спунайного разброса		ПЭ		
	и пости мотолики г	да 10 п 5 3 РМГ 61 90	10	
показатель прави	топости мстодики і	10 11.3.5 1 1111 01 20	L V	

u⊖ (стандартная		0.11		
неопределенность. обусловленная				
смещением), мкг				
U ₀ (расширенная		0.21		
неопределенность обусловленная				
смещением), мкг				
U ₀ (относительная расширенная		5.3		
неопределенность), %				
Показатель точ	ности методики по	п.5.4 РМГ 61 2010		
um (суммарная стандартная				
неопределенность), мкг		0.21		
U _m (суммарная расширенная		0.43		
неопределенность), мкг				
Um(относительная суммарная		10.7		
расширенная неопределенность				
неопределенность), %				
СДІ	⁻ ИТ=7.6 мкг /на пла	астине		
Наименование	день 1	день 2	день 3	
	7.75	6.98	7.95	
	6.84	7.65	7 70	
	8 28	7 56	7.63	
	8.15	7.50	7.05	
	8.13	7.08	<i>1.32</i> <u>8.32</u>	
	8.00	7.73	8.22	
ср. знач. в серии	/.80	/.52	/.80	
S (СКО в серии)	0.574	0.313	0.284	
отн. S(отн. СКО), %	7.4	4.2	3.6	
<u>S²</u>	0.3300	0.0981	0.0805	
$(\sum S)^2$		0.51		
$\max(\sum S)^2$		0.33		
Gэксп.		0.649		
Gтабл		0.746		
Однородность дисперсий		да		
Показатель повторя	яемости методики п	ю п.5.2.1 РМГ 61 2	010	
σ _г (СКО повторяемости		0.41		
методики), мкг				
общее среднее		7.71		
σ _г (отн. СКО повторяемости		5.3		
методики), %				
СКО среднего арифметического	0 163			
Показатель промежуто	чной прецизионнос	ги по п. 5.2.2 РМГ	61 2010	
σ _R (СКО промежуточной		0.374		
прецизионности), мкг				
σ _R (отн. СКО промежуточной		4.8		
прецизионности), %				
Определение систематической составляющей погрешности по п.5.3				
РМГ 61 2010				
Смещение, мкг		0.030		
отн. смещение, %		0.4		

t_эксп.	0.44
t_табл.	4.30
смещение незначимо на фоне	
случайного разброса	да
Показатель прави	льности методики по п.5.3 РМГ 61 2010
uө (стандартная	0.094
неопределенность. обусловленная	
смещением), мкг	
U ₀ (расширенная	0.19
неопределенность обусловленная	
смещением), мкг	
U ₀ (относительная расширенная	2.44
неопределенность), %	
Показатель точ	ности методики по п.5.4 РМГ 61 2010
um (суммарная стандартная	
неопределенность), мкг	0.19
U _m (суммарная расширенная	0.38
неопределенность), мкг	
U _m (относительная суммарная	4.9
расширенная неопределенность	
неопределенность), %	

Метрологические характеристики ВЭЖХ методики количественного анализа

тиомочевины и *транс-ДГИТ* в реакционной массе

Концентрацию тиомочевины рассчитывали по градуировочной зависимости: y = 0,0001x + 0,0081.

Таблица А5 – Значения площадей пиков и рассчитанные по ним концентрации тиомочевины

С(тиомочевины)=0,02моль/л			
1 день измерений			
Площадь пика	Стиомочевины, моль/л		
118	0.02		
117	0.02		
115	0.02		
116	0.02		
119	0.02		
2 день измерений			
120	0.02		
122	0.02		
124	0.02		
123	0.02		
126	0.02		
3 день измерений			
124 0.02			

120	0.02		
121	0.02		
123	0.02		
125	0.02		
С(тиомочевинь	I)=0,08 моль/л		
1 день изм	мерений		
699.82	0.07808		
716	0.07970		
739.18	0.08202		
723.6	0.08046		
759	0.08400		
2 лень из	мерений		
686	0.07670		
696	0.07770		
712	0.07930		
688	0.07590		
710	0.07030		
/10	0.07910		
<u> </u>	о оказор		
749	0.08300		
/30	0.08170		
/12.6	0.0/936		
/26	0.08070		
/54	0.08350		
С(тиомочевини	ы)=0,2 моль/л		
I день измерений			
Площадь пика	Стиомочевины, моль/л		
1961.56	0.20		
1934.38	0.20		
1928.5	0.20		
1920.6	0.20		
1935	0.20		
2 день изм	мерений		
1853.1	0.19		
1848	0.19		
1825	0.19		
1836	0.19		
1811.1	0.19		
3 день измерений			
1793	0.19		
1748	0.18		
1833.9	0.19		
1836	0.19		
1883.1	0.20		
С(тиомочевин	ы)=0.4 моль/л		
1 лень измерений			
3559.83	0.36		
	U.JU		

3560.04	0.27			
2600 52	0.37			
2508.12	0.38			
3098.13	0.37			
3622.2	0.37			
2 день из	мерений			
3733.45	0.38			
3769.86	0.39			
3735.8	0.38			
3745.96	0.38			
3769.86	0.39			
3 день из	мерений			
3859.83	0.39			
3799.4	0.39			
3786.1	0.39			
3899.5	0.40			
3846.6	0.39			
С(тиомочевин	С(тиомочевины)=0.8моль/л			
1 день измерений				
7862.26	0.79			
7778.34	0.79			
7890	0.80			
7769.49	0.79			
7875.34	0.80			
2 деньиз	мерений			
7662.26	0.77			
7688.22	0.78			
7680.11	0.78			
7669.4	0.78			
7585.34	0.77			
3 леньизмерений				
7778.34	0.79			
7670.8	0.78			
7639.4	0.77			
7675.23	0.78			
7723.5	0.78			

Таблица А6 – Метрологические характеристики ВЭЖХ методики количественного анализа тиомочевины, рассчитанные по п.5РМГ 61 2010

Стиомочевины=0,02 моль/л					
Наименование день 1 день 2 день 3					
	0.02	0.02	0.02		
	0.02	0.02	0.02		
	0.02	0.02	0.02		

	0.02	0.02	0.02
	0.02	0.02	0.02
ср. знач. в серии	0.02	0.02	0.02
S (СКО в серии)	0.0001581	0.0002236	0.0002387
отн. S(отн. СКО), %	0.000000132		
S^2	0.0000000	0.0000001	0.0000001
$(\Sigma S)^2$		0.000000132	
$\max(\sum S)^2$		$5.7 \cdot 10^8$	
Сэксп.		0.432	
Gтабл		0.746	
Однородность дисперсий		да	
Показатель повт	оряемости методики	и по п.5.2.1 РМГ 61	2010
σ _г (СКО повторяемости		0.00021	
методики), моль/л			
общее среднее		0.02	
σ _г (отн. СКО повторяемости		1.0	
методики), %			
СКО среднего арифметического		0.00034	
Показатель промежу	гочной прецизионн	ости по п. 5.2.2 РМГ	[°] 61 2010
σ _R (СКО промежуточной			
прецизионности), моль/л		0.0004	
σ _R (отн. СКО промежуточной			
прецизионности), %	1.9		
Определение система	ТИЧЕСКОИ СОСТАВЛЯ DMT (1 2010	ющеи погрешности	по п.5.3
		0.00010	
	10		
отн. Смещение, 76	0.98		
t_9KCII.	<u> </u>		
	JU.JU		
случайного разброса	па		
Показатель пра	рипі пости матопии	да и по п 5 3 РМГ 61 20)10
показатсяв пра	вильности мстодик.)10
неопрелеленность.			
обусловленная смешением).			
моль/л		0.0025	
Uo (расширенная			
неопределенность,			
обусловленная приготовлением			
раствора, моль/л			
Uө (расширенная			
неопределенность			
обусловленная смещением),		0.0040	
МОЛЬ/Л		0.0049	
Ue (относительная			
расширенная		21 56	
псопределенность), 70	MILLOTH MOTO THESE	24.JU	
Показатель точности методики по п.5.4 РМГ 61 2010			

um (суммарная стандартная		0.0025	
неопределенность), моль/л			
Um (суммарная расширенная			
неопределенность), моль/л		0.01	
Um (относительная суммарная			
расширенная неопределенность			
неопределенность), %		25.0	
Ст	гиомочевины=0,08	моль/л	
Наименование	день 1	день 2	день 3
	0.08	0.08	0.08
	0.08	0.08	0.08
	0.08	0.08	0.08
	0.08	0.08	0.08
	0.08	0.08	0.08
ср. знач. в серии	0.08	0.08	0.08
S (СКО в серии)	0.002	0.001	0.002
отн. S(отн. СКО), %	2.8	1.6	2.0
S^2	0.0000051	0.0000015	0.0000027
$(\sum S)^2$		$9.2 \cdot 10^{6}$	
$\max(\sum S)^2$		$5.1 \cdot 10^{6}$	
Gэксп.	0.553		
Gтабл	0.746		
Однородность дисперсий	ла		
Показатель повторяемости метолики по п.5.2.1 РМГ 61 2010			
σ _r (СКО повторяемости			
методики), моль/л		0.002	
общее среднее	0.08		
σ _г (отн. СКО повторяемости			
методики), %	2.2		
СКО среднего арифметического		0.0017	
Показатель промежут	очной прецизионн	ости по п. 5.2.2 PMI	[°] 61 2010
σ _R (СКО промежуточной			
прецизионности), моль/л		0.0022	
σ _R (отн. СКО промежуточной		2.7	
прецизионности), %		2.1	5 2
Определение системат	гическои составля РМГ 61 2010	ющеи погрешности	по п.5.3
Смещение, моль/л		0.00015	
отн. Смещение, %		0.2	
t эксп.	0.15		
t табл.		4.30	
смещение незначимо на фоне			
случайного разброса	да		
Показатель прав	ильности методик	и по п.5.3 РМГ 61 20	010
иө (стандартная			
неопределенность.			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.0027	

Uө (расширенная			
неопределенность			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.0053	
U_{Θ} (относительная			
расширенная			
неопределенность), %		6.64	
Показатель т	очности методики г	<u>ю п.5.4 РМГ 61 2010</u>	
um (суммарная стандартная		0.0031	
неопределенность), моль/л			
Um (суммарная расширенная		0.04	
неопределенность), моль/л		0.01	
Um (относительная суммарная			
расширенная неопределенность		- 0	
неопределенность), %		7.8	
	Стиомочевины=0,2	моль/л	
Наименование	день 1	день 2	день 3
	0.20	0.19	0.19
	0.20	0.19	0.18
	0.20	0.19	0.19
	0.20	0.19	0.19
	0.20	0.19	0.19
	0.20	0.19	0.19
ср. знач. в серии	0.20	0.19	0.19
S (СКО в серии)	0.002	0.002	0.004
отн. S(отн. СКО), %	0.8	0.9	1.9
S ²	0.0000024	0.000003	0.00001
$(\sum S)^2$	$1.8 \cdot 10^5$		
$\max(\sum S)^2$	1.3.105		
Gэксп.	0.711		
Gтабл		0.746	
Однородность дисперсий	да		
Показатель повт	оряемости методикі	и по п.5.2.1 РМГ 61	2010
σ _г (СКО повторяемости			
методики), моль/л		0.002	
общее срелнее		0.19	
σ _г (отн. СКО повторяемости			
методики), %		1.3	
СКО среднего арифметического		0.007	
Показатель промежу	точной прецизионн	ости по п. 5.2.2 РМГ	61 2010
σ _R (СКО промежуточной	•		
прецизионности), моль/л		0.0072	
σ _R (отн. СКО промежуточной			
прецизионности), %		3.7	
Определение систематичес	кой составляющей	погрешности по п.5.	<u>З РМГ 61 2010</u>
Смещение, моль/л		0.0061	
отн. смещение. %		3.0	
t-критерий рассчитывали по формуле			
т эксп	1 1	1 52	
ι_σκοπ.		1.04	

t табл.	4.30		
смещение незначимо на фоне	1.50		
случайного разброса	ла		
Показатель правильности метолики по п.5.3 РМГ 61 2010			10
иө (стандартная			
неопределенность.			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.005	
U _Ө (расширенная			
неопределенность			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.0094	
U ₀ (относительная			
расширенная			
неопределенность), %		4.8	
Показатель т	очности методики і	по п.5.4 РМГ 61 2010	
um (суммарная стандартная			
неопределенность), моль/л		0.008335205	
Um (суммарная расширенная			
неопределенность), моль/л		0.02	
U _m (относительная суммарная			
расширенная неопределенность			
неопределенность), %		8.3	
Наименорание			пони 3
Паименование	<u>день 1</u> 0.26	<u>дснь 2</u> 0.29	<u>день 5</u> 0 20
	0.30	0.30	0.39
	0.37	0.39	0.39
	0.38	0.38	0.39
	0.37	0.38	0.40
	0.37	0.39	0.39
ср. знач. в серии	0.37	0.38	0.39
S (СКО в серии)	0.005	0.002	0.005
отн. S(отн. СКО), %	1.4	0.5	1.4
S^2	0.000026	0.0000032	0.000029
$(\sum S)^2$		$5.9 \cdot 10^5$	
$\max(\sum S)^2$		$2.98 \cdot 10^5$	
Gэксп.	0.503		
Бтаб л	0.746		
Олноролность лисперсий	ла		
Показатель повт	оряемости метолики по п.5.2.1 РМГ 61 2010		
σr (СКО повторяемости			
метолики). моль/л		0.004	
общее среднее		0.38	
б. (отн. СКО повторяемости		0.00	
метолики) %		1.2	
СКО среднего эрифметического		0.011	
	гоциой пренизиони	ости по п 5 7 7 РМГ	61 2010
	со шон прецизиони	UVIN NU NI UMANA I WII	VI MUIV

σ _R (СКО промежуточной			
прецизионности), моль/л		0.012	
σ _R (отн. СКО промежуточной			
прецизионности), %		3.0	
Определение систематичесн	сой составляющей і	1огрешности по п.5	.3 РМГ 61 2010
Смещение, моль/л		0.019	
отн. смещение, %		4.8	
t эксп.		3.03	
t табл.		4.30	
смещение незначимо на фоне			
случайного разброса		да	
Показатель пра	вильности методик	и по п.5.3 РМГ 61 2	010
иө (стандартная			
неопределенность.			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.0068	
Uө (расширенная			
неопределенность			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.014	
U_{Θ} (относительная			
расширенная		2.57	
неопределенность), %		3.57	•
Показатель т	очности методики п	ю п.5.4 РМГ 61 201	0
u _m (суммарная стандартная		0.012	
неопределенность), моль/л	0.015		
От (суммарная расширенная		0.02	
		0.03	
От (относитсльная суммарная			
неопределенность) %		64	
neonpedenennoend), //		0.1	
	Стиомочевины=0,8	моль/л	
Наименование	день 1	день 2	день 3
	0.79	0.77	0.79
	0.79	0.78	0.78
	0.80	0.78	0.77
	0.79	0.78	0.78
	0.80	0.77	0.78
ср. знач. в серии	0.79	0.77	0.78
S (СКО в серии)	0.006	0.004	0.005
отн. S(отн. СКО), %	0.7	0.5	0.7
S^2	0.00003	0.00002	0.00003
$(\sum S)^2$		$7.9 \cdot 10^5$	
$\max(\sum S)^2$		$3.2 \cdot 10^5$	
Бэксп.		0.409	
 Gтабл		0.746	
Олноролность лисперсий		ла	
Показатель повто	ряемости метолики	и по п.5.2.1 РМГ 61	2010
	r		

σr (СКО повторяемости		
метолики), моль/л	0.005	
общее среднее	0.78	
σ _г (отн. СКО повторяемости		
методики), %	0.7	
СКО среднего арифметического	0.009	
Показатель промежу	точной прецизионности по п. 5.2.2 РМГ 61 2010	
σ _R (СКО промежуточной		
прецизионности), моль/л	0.010	
σ _R (отн. СКО промежуточной		
прецизионности), %	1.3	
Определение систематичес	кой составляющей погрешности по п.5.3 РМГ 61 2010	
Смещение, моль/л	0.019	
отн. смещение, %	2.4	
t эксп.	3.51	
 t_табл.	4.30	
смещение незначимо на фоне		
случайного разброса	да	
Показатель правильности методики по п.5.3 РМГ 61 2010		
uө (стандартная		
неопределенность.		
обусловленная смещением),		
моль/л	0.0059	
U ₀ (расширенная		
неопределенность		
обусловленная смещением),		
моль/л	0.0119	
U_{Θ} (относительная		
расширенная		
неопределенность), %	1.52	
Показатель точности методики по п.5.4 РМГ 61 2010		
u _m (суммарная стандартная		
неопределенность), моль/л	0.011057258	
U _m (суммарная расширенная	0.02	
неопределенность), моль/л	0.02	
U _m (относительная суммарная		
расширенная неопределенность	2.0	
неопределенность), %	2.8	

Концентрацию *транс-*ДГИТ определяли по уравнению градуировки: у = 0,0002х + 0,0015

Таблица А7 – Значения площадей пиков и рассчитанные по ним концентрации *транс*-ДГИТ

С(ДГИТ)=0,017 моль/л		
1 день измерений		
83.24	0.01815	
82.5	0.01800	

83.3	0.01816	
85	0.01850	
79.6	0.01742	
2 день изм	лерений	
85	0.01850	
88	0.01910	
80.5	0.01760	
84.8	0.01846	
78	0.01710	
3 день изм	лерений	
89.5	0.01940	
88	0.01910	
87.6	0.01902	
85.3	0.01856	
86.1	0.01872	
С(ДГИТ)=0,	034 моль/л	
1 день изм	лерений	
176.7	0.04	
175.6	0.04	
175.1	0.04	
176.9	0.04	
176	0.04	
2 день измерений		
176.7	0.04	
178.6	0.04	
176	0.04	
179	0.04	
176	0.04	
3 день изм	лерений	
165	0.03	
169	0.04	
166	0.03	
168	0.04	
170	0.04	
С(ДГИТ)=0,	34 моль/л	
1 день изм	лерений	
1645.4	0.33	
1665.5	0.33	
1682.4	0.34	
1672.4	0.34	
1662.4	0.33	
2 день изм	лерений	
1700.4	0.34	
1720.4	0.35	
1768	0.36	
1735	0.35	

1756	0.35	
3 день измерений		
1712	0.34	
1698	0.34	
1747	0.35	
1739	0.35	
1756	0.35	
С(ДГИТ)=0.	,85 моль/л	
1 день изм	лерений	
4280	0.86	
4257	0.85	
4226	0.85	
4250	0.85	
4232	0.85	
2 день изм	лерений	
4320	0.87	
4280	0.86	
4268	0.86	
4276	0.86	
4255	0.85	
3 день измерений		
4280	0.86	
4213	0.84	
4243	0.85	
4220	0.85	
4212	0.84	

Таблица А8 – Метрологические характеристики ВЭЖХ методики количественного анализа ДГИТ в реакционной массе, рассчитанные по п. 5 РМГ 61 2010

СДГИТ=0,017 моль/л			
Наименование	день 1	день 2	день 3
	0.0181	0.0185	0.0194
	0.0180	0.0191	0.0191
	0.0182	0.0176	0.0190
	0.0185	0.0185	0.0186
	0.0174	0.0171	0.0187
ср. знач. в серии	0.02	0.02	0.02
S (СКО в серии)	0.000	0.001	0.000
отн. S(отн. СКО), %	2.2	4.4	1.7
S^2	0.00000016	0.0000063	0.00000011
$(\sum S)^2$		$8.9 \cdot 10^{7}$	
$\max(\sum S)^2$	6.3.107		
Сэксп.	0.705		
Gтабл	0.746		
Однородность дисперсий		да	

Показатель повторяемости методики по п.5.2.1 РМГ 61 2010			
σ _г (СКО повторяемости		0.001	
методики), моль/л			
общее среднее		0.02	
σr (отн. СКО повторяемости		3.0	
методики), %			
СКО среднего арифметического		0.0005	
Показатель промежу	точной прецизионно	ости по п. 5.2.2 РМГ	61 2010
σ _R (СКО промежуточной		0.0007	
прецизионности), моль/л			
σ _R (отн. СКО промежуточной		3.6	
прецизионности), %			
Определение систематичес	кой составляющей і	погрешности по п.5.	3 РМГ 61 2010
Смещение, моль/л		0.0014	
отн. смещение, %		8.2	
t_эксп.		4.80	
t табл.		4.30	
	Смещение значимо	на фоне случайного	разброса, поэтому
смещение незначимо на фоне	в формуле расч	ета расширенной нес	определенности
случайного разброса	опреде	ляем учитываем сме	щение.
Показатель пра	вильности методик	и по п.5.3 РМГ 61 20)10
uө (стандартная			
неопределенность.			
обусловленная смещением),			
моль/л	0.0025		
Uө (расширенная			
неопределенность			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.0049	
U_{Θ} (относительная			
расширенная			
неопределенность), %	27.1		
Показатель т	очности методики п	ю п.5.4 РМГ 61 2010	
u _m (суммарная стандартная		0.00054	
неопределенность), моль/л		0.00254	
U _m (суммарная расширенная		0.01	
неопределенность), моль/л		0.01	
U _m (относительная суммарная			
расширенная неопределенность	20.0		
неопределенность), %	29.9		
	СДГИТ=0,034 мо.	ль/л	
Наименование	день 1	день 2	день 3
	0.04	0.04	0.03
	0.04	0.04	0.04
	0.04	0.04	0.03
	0.04	0.04	0.04
	0.04	0.04	0.04
ср. знач. в серии	0.04	0.04	0.04

S (СКО в серии)	0.000	0.000	0.000
отн. S(отн. СКО), %	0.4	0.8	1.2
S^2	0.00000002	0.00000008	0.00000017
$(\sum S)^2$	2.8.107		
$\max(\sum S)^2$	$1.7 \cdot 10^{7}$		
Gэксп.		0.620	
<u> </u>		0.746	
		., 10	
Показатель порт	полемости метолики	<u>μα</u> μ πο π 5 2 1 ΡΜΓ 61 ²	2010
о. (СКО повторяемости	орясмости методикі		2010
метолики) моль/п		0.0003	
общее среднее		0.04	
от (отн СКО повторяемости		0.01	
методики). %		0.8	
СКО среднего арифметического		0.0011	
Показатель промежу	точной пренизионн	ости по п. 5.2.2 РМГ	61 2010
σ _R (СКО промежуточной	inpediononin		
прецизионности), моль/л		0.0011	
σ _R (отн. СКО промежуточной			
прецизионности), %		3.0	
Определение систематичес	кой составляющей	погрешности по п.5.	3 РМГ 61 2010
Смещение, моль/л		0.0022	
отн. смещение, %		6.6	
t эксп.	3.66		
 t_табл.	4.30		
смещение незначимо на фоне			
случайного разброса		да	
Показатель правильности методики по п.5.3 РМГ 61 2010			
u _Ө (стандартная			
неопределенность.			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.0025	
Uө (расширенная			
неопределенность			
обусловленная смещением),		0.0051	
МОЛЬ/Л		0.0051	
О⊖ (относительная			
расширенная		141	
неопределенность), %			
Показатель т	очности методики і	10 II.5.4 PMI 01 2010	
и _т (суммарная стандартная неопределенность) мощ /ч		0 002756308	
Пеопределенноств), моль/л		0.002750500	
неопределенность) моль/п		0.01	
Um (относительная суммарная		0.01	
расширенная неопрелеленность			
неопределенность), %		16.2	
		/	
	∪ді и і =0,34 мој	IB/JI	

		[]	
Наименование	день 1	день 2	день 3
	0.33	0.34	0.34
	0.33	0.35	0.34
	0.34	0.36	0.35
	0.34	0.35	0.35
	0.33	0.35	0.35
ср. знач. в серии	0.33	0.35	0.35
S (СКО в серии)	0.003	0.005	0.005
отн. S(отн. СКО), %	0.8	1.6	1.4
S^2	0.00001	0.00003	0.00002
$(\Sigma S)^2$		6.1·10 ⁵	
$\max(\sum S)^2$		$2.9 \cdot 10^5$	
<u> </u>		0.483	
Стабл		0.746	
Олноролность лисперсий		ла	
Показатель повт	пяемости метолики	ди и по п 5 2 1 РМГ 61 ′	2010
от (СКО повторяемости	эрисмости методики		2010
метолики), моль/л		0.005	
общее среднее		0.34	
σ _г (отн. СКО повторяемости			
методики), %		1.3	
СКО среднего арифметического	0.0078		
Показатель промежуточной прецизионности по п. 5.2.2 РМГ 61 2010			
σ _R (СКО промежуточной	•		
прецизионности), моль/л		0.0086	
σ _R (отн. СКО промежуточной			
прецизионности), %		2.5	
Определение систематичес	кой составляющей і	погрешности по п.5.	3 РМГ 61 2010
Смещение, моль/л		0.0036	
отн. смещение, %		1.1	
t эксп.	0.80		
t табл.		4.30	
смещение незначимо на фоне			
случайного разброса		да	
Показатель пра	вильности методик	и по п.5.3 РМГ 61 20)10
иө (стандартная			
неопределенность.			
обусловленная смещением),			
моль/л		0.005	
U_{Θ} (расширенная			
неопределенность			
обусловленная смещением),		0.01	
МОЛЬ/Л		0.01	
Он (относительная			
расширенная неопределенность) %		2 00	
Показатони т	ОППОСТИ МОТОЛИКИ Р	<u>2.77</u> ю п 5 / РМГ 61 2 010	l
по показатель т	очности методики I	IV 11.J. T I IVII VI 2010	

um (суммарная стандартная	
неопределенность), моль/л	0.0094
Um (суммарная расширенная	
неопределенность), моль/л	0.02
U _m (относительная суммарная	
расширенная неопределенность	
неопределенность), %	5.5