**Министерство образования и науки Российской Федерации**
федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования

**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт Физико-технический

Направление подготовки Физика

Кафедра Общей физики

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

| Тема работы |
|---|
| Характеристика структуры индивидуального полисахарида люцерны посевной методом ЯМР спектроскопии |

УДК _____

Студент

| Группа | ФИО | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|
| 0Б21 | Попугаев Евгений Вадимович | | |

Руководитель

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|
| инженер | Кривощеков С.В. | | | |

## КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|
| доцент | Сечина А.А. | к-т хим. наук | | |

По разделу «Социальная ответственность»

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|
| профессор | Федорчук Ю.М. | д-р тех. наук | | |

## ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

| Зав. кафедрой | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|
| общей физики | Лидер А.М. | к.ф.-м.н. | | |

Томск – 2016 г.

Планируемые результаты обучения

По основной образовательной программе высшего профессионального образования, направление подготовки Физика,

квалификация - бакалавр

| Код результата | Результат обучения (компетенции выпускника) | Требования ФГОС, критериев и/или заинтересованных сторон |
|---|---|---|
| *Общекультурные (универсальные) компетенции* | | |
| Р1 | Способен самостоятельно приобретать новые знания, использовать современные образовательные и информационные технологии, совершенствовать и развивать свой профессиональный уровень, поддерживать здоровый образ жизни | Требования ФГОС (*ОК-1*, *ОК-2*, *ОК-7, ОК-8, ОК-11*, *ОК-19*) [2], Критерий 5 АИОР (п. 1.1, 2.6), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| Р2 | Способен к поиску, обработке и интерпретации с использованием современных информационных технологий данных, необходимых для формирования суждений по соответствующим социальным, научным и этическим проблемам, как в коллективе, так и индивидуально (на родном и иностранном языке) | Требования ФГОС (*ОК-3*, *ОК-4*, *ОК_8, ОК-14, ОК-15*, *ПК-10*, *ПК-12*, *ПК-13*,), Критерий 5 АИОР (пп. 2.1, 2.2, 2.3), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| Р3 | Способен критически переосмысливать свой накопленный социальный и профессиональный опыт, изменять при необходимости профиль своей профессиональной деятельности, следовать этическим и правовым нормам и нести ответственность за последствия своей инженерной деятельности | Требования ФГОС (*ОК-5*, *ОК-6*, *ОК-7, ОК-9*, *ОК-10*, *ПК-5*, *ПК-18*), Критерий 5 АИОР (пп. 2.4, 2.5), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| *Профессиональные компетенции* | | |
| Р4 | Способен к овладению и применению базовых знаний в области естественных наук и математики для решения профессиональных задач, к усвоению основных педагогических моделей, форм и приемов педагогического воздействия на личность; | Требования ФГОС (*ОК-1*, *ОК-9*, *ОК-10, ОК-11*, *ПК-1, ПК-2, ПК-10*), Критерий 5 АИОР (п. 1.1), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| Р5 | Способен применить в проектах по тематике, заданной заинтересованными организациями, экспериментальные методы исследования конденсированного состояния вещества, методы анализа поверхности твердых тел и тонких пленок | Требования ФГОС (ОК-12, ПК-3, ПК-4, ПК-6, ПК-14) , Критерий 5 АИОР (п. 1.1, 1.4, 2.2, 2.6), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| Р6 | Способен применить в проектах по тематике, заданной заинтересованными организациями, современную электронику в электрофизических и плазменных установках, а также учесть взаимодействие излучения и плазмы с веществом, современные достижения водородной энергетики и плазменных технологий | Требования ФГОС (*ОК-10, ОК-11, ПК-1, ПК-2*), Критерий 5 АИОР (п. 1.1), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| Р7 | Способен применить в проектах по тематике, заданной заинтересованными организациями, базовые естественнонаучные и математические знания при получении и исследовании наноматериалов | Требования ФГОС (ОК-12, ПК-3, ПК-4, ПК-6, ПК-14) , Критерий 5 АИОР (п. 1.1, 1.4, 2.2, 2.6), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| Р8 | Способен понимать сущность и значение | Требования ФГОС |

| | | |
|---|---|---|
| | информации в развитии современного информационного общества, к применению на практике полученных знаний при обработке, анализе и синтезе полученных физических данных в соответствии с профилем профессиональной деятельности | (*ОК-12*, *ОК-16*, *ОК-21.ПК-1*, *ПК-2, , ПК-5, ПК-6, ПК-7*), Критерий 5 АИОР (п. 1.1), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| Р9 | Способен понимать и использовать на практике теоретические основы планирования и организации физических исследований, представлять результаты и применять на практике методы управления в сфере природопользования | Требования ФГОС (ОК-12, ПК-3, ПК-4, ПК-6, ПК-7, ПК-8, ПК-9, ПК-14) , Критерий 5 АИОР (п. 1.1, 1.4, 2.2, 2.6), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |
| Р10 | Способен формировать суждения о значении и последствиях своей профессиональной деятельности с учетом социальных, правовых, этических и природоохранных аспектов, при необходимости применить ресурсо- и энергосберегающие технологии | Требования ФГОС (*ОК-10, ОК-11, ПК-1, ПК-2, ПК-7*, *ПК-9*), Критерий 5 АИОР (п. 1.1), согласованный с требованиями международных стандартов *EUR-ACE* и *FEANI* |

**Министерство образования и науки Российской Федерации**
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт Физико-технический

Направление подготовки (специальность)Физика
Кафедра Общей физики

УТВЕРЖДАЮ:

Зав. кафедрой

Лидер А.М.

(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение выпускной квалификационной работы**

В форме:

| Бакалаврской работы |
|---|

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

| Группа | ФИО |
|---|---|
| 0Б21 | Попугаеву Евгению Вадимовичу |

Тема работы:

| Характеристика структуры индивидуального полисахарида люцерны посевной методом ЯМР спектроскопии | |
|---|---|
| Утверждена приказом директора (дата, номер) | |

| Срок сдачи студентом выполненной работы: | |
|---|---|

**ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:**

| **Исходные данные к работе** *(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т.д.).* | – Надземная часть люцерны посевной; |
|---|---|

| | |
|---|---|
| **Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов**<br>*(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).* | – проведение литературного обзора;<br>– Выделение полисахаридного комплекса;<br>– Выделение индивидуального полисахарида;<br>– Исследование индивидуального полисахарида методом ГХ-МС<br>– Исследование индивидуального полисахарида методом ЯМР спектроскопии;<br>– анализ полученных результатов;<br>– дополнительные разделы: «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение», «Социальная ответственность». |

| **Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы** *(с указаниемразделов)* | |
|---|---|
| **Раздел** | **Консультант** |
| Литературный обзор | Кривощеков С.В. инженер Кафедры ТОВПМ ИПР |
| Экспериментальная часть | Кривощеков С.В. инженер Кафедры ТОВПМ ИПР |
| Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение | Сечина А.А. доцент каф. МЕН ИСГТ ТПУ |
| Социальная ответственность | Федорчук Ю.М. профессор каф. ЭБЖ ИНК ТПУ |
| **Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:** | |
| Глава 1 Литературный обзор | |

| | |
|---|---|
| **Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику** | 1.03.14 |

**Задание выдал руководитель:**

| **Должность** | **ФИО** | **Ученаястепень, звание** | **Подпись** | **Дата** |
|---|---|---|---|---|
| инженер | Кривощеков С.В. | | | |

**Задание принял к исполнению студент:**

| **Группа** | **ФИО** | **Подпись** | **Дата** |
|---|---|---|---|
| 0Б21 | Попугаев Евгений Вадимович | | |

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА**

**«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

| Группа | ФИО |
|---|---|
| 0Б21 | Попугаеву Евгению Вадимовичу |

| Институт | ФТИ | Кафедра | Общая физика |
|---|---|---|---|
| Уровень образования | бакалавр | Направление/специальность | 011200 |

| **Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:** | |
|---|---|
| *1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих* | *Определение стоимости ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых информационных и человеческих* |
| *2. Нормы и нормативы расходования ресурсов* | *Ознакомление и отбор норм и нормативов расходования ресурсов* |
| *3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования* | *Ознакомление с системой налогообложения, со ставками налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования* |
| **Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:** | |
| *1. Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения* | *Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ* |
| *2. Планирование и формирование бюджета научных исследований* | *Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет* |
| *3. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования* | *Определение ресурсной, финансовой, экономической составляющей* |
| **Перечень графического материала** *(с точным указанием обязательных чертежей)***:** | |
| *1. Оценка конкурентоспособности технических решений;*<br>*2. Альтернативы проведения НИ;*<br>*3. График проведения и бюджет НИ;*<br>*4. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НИ.* | |

| **Дата выдачи задания для раздела по линейному графику** | |
|---|---|

**Задание выдал консультант:**

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|
| Доцент | Сечина Ася Александровна | Кандидат химических наук | | |

**Задание принял к исполнению студент:**

| Группа | ФИО | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|
| 0Б21 | Попугаев Евгений Вадимович | | |

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА**

**«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

| Группа | ФИО |
|---|---|
| 0Б21 | Попугаеву Евгению Вадимовичу |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Институт** | Физико-технический | **Кафедра** | Общая физика |
| **Уровень образования** | Бакалавриат | **Направление/ специальность** | Физика |

**ЗАДАНИЕ**

| | |
|---|---|
| **Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:** | 1. Описание рабочего места (рабочей зоны, технологического процесса, механического оборудования) на предмет возникновения:<br>– вредных проявлений факторов производственной среды ( производственный шум, микроклимат, освещенность)<br>– опасных проявлений факторов производственной среды (электрической, пожарной природы) |
| **Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке** | 1. Анализ выявленных вредных факторов проектируемой производственной среды в следующей последовательности:<br>– физико-химическая природа вредности, её связь с разрабатываемой темой;<br>– действие фактора на организм человека;<br>– приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ);<br>– предлагаемые средства защиты (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства)<br>2. Анализ выявленных опасных факторов проектируемой произведённой среды в следующей последовательности<br>– механические опасности (источники, средства защиты;<br>– термические опасности (источники, средства защиты);<br>– электробезопасность<br>– пожаробезопасность (причины, профилактические мероприятия, первичные средства пожаротушения)<br>3. Охрана окружающей среды:<br>– анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы);<br>– анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); |

| | |
|---|---|
| | – анализ воздействия объекта на литосферу (отходы);<br>4. Защита в чрезвычайных ситуациях:<br>– перечень возможных ЧС на объекте;<br>– выбор наиболее типичной ЧС;<br>– разработка превентивных мер по предупреждению ЧС;<br>– разработка мер по повышению устойчивости объекта к данной ЧС;<br>– разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий<br>5. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:<br>– специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны)<br>– правовые нормы трудового законодательства;<br>– организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны |

| **Дата выдачи задания для раздела по линейному графику** | |
|---|---|

**Задание выдал консультант:**

| **Должность** | **ФИО** | **Ученая степень, звание** | **Подпись** | **Дата** |
|---|---|---|---|---|
| Профессор кафедры ЭБЖ | Федорчук Юрий Митрофанович | доктор технических наук | | |

**Задание принял к исполнению студент:**

| **Группа** | **ФИО** | **Подпись** | **Дата** |
|---|---|---|---|
| 0Б21 | Попугаев Евгений Вадимович | | |

**Министерство образования и науки Российской Федерации**
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт Физико-технический

Направление подготовки (специальность)Физика
Уровень образования бакалавриат

Кафедра Общей физики

Период выполнения (осенний / весенний семестр 2015/2016 учебного года)

Форма представления работы:

| |
|---|
| Бакалаврская работа |

(бакалаврская работа, дипломный проект/работа, магистерская диссертация)

## КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН

### выполнения выпускной квалификационной работы

| | |
|---|---|
| Срок сдачи студентом выполненной работы: | 11.06.15 |

| Дата контроля | Название раздела (модуля)/ вид работы (исследования) | Максимальный балл раздела (модуля) |
|---|---|---|
| 15.05.2015 г. | Обзор литературы | 20 |
| 20.05.2015 г. | Объект и методы исследования | 25 |
| 23.05.2015 г. | Расчет и аналитика | 25 |
| 15.05.2015 г. | Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение | 15 |
| 12.05.2015 г. | Социальная ответственность | 15 |

Составил преподаватель:

| Должность | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|
| Ассистент КОФ | Лаптев Р.С. | | | |

**СОГЛАСОВАНО:**

| Зав. кафедрой | ФИО | Ученая степень, звание | Подпись | Дата |
|---|---|---|---|---|
| Общей физики | Лидер А.М. | к.ф.-м.н. | | |

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ ..... 12
ПОЛУЧЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ ..... 14
Люцерна ..... 14
Полисахариды ..... 16
Характеристика полисахаридов ..... 16
Способы получения полисахаридов ..... 18
Экстракция из растительного сырья ..... 18
Ионообменная хроматография полисахаридных комплексов ..... 19
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ 20
Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) ..... 20
Масс-спектроскопия ..... 21
Ввод образца ..... 23
Ионизация ..... 24
Ионизация электронами ..... 25
Полевая ионизация ..... 27
Электрораспыление ..... 28
Вторично-ионная масс-спектрометрия ..... 30
Масс-анализаторы ..... 31
Секторные приборы ..... 32
Квадрупольные приборы ..... 35
Ионные ловушки ..... 37
Времяпролетные масс-спектрометры ..... 37
Детектирование ионов ..... 38
ЯМР спектроскопия ..... 39
Квантовомеханическая модель изолированного протона ..... 40
Условие резонанса ..... 42
Принципы работы спектрометра ЯМР и его особенности ..... 43
Спиновые взаимодействия ..... 45
Спин-решеточное время релаксации ..... 45

Спин-спиновое взаимодействие ..... 47
Химический сдвиг ..... 48
δ-шкала, τ-шкала, интегрирование сигнала ..... 50
Простые правила интерпретации сверхтонкой структуры в спектрах ..... 52
Влияние электронной плотности на протоне и соседних атомах углерода ..... 55
Эффект кольцевого тока в циклических системах ..... 58

# ВВЕДЕНИЕ

Среди культивируемых растений встречается немало видов, которые широко используются в официальной медицине, но ввиду отсутствия научно-обоснованных данных о химическом составе и фармакологических свойствах еще не применяются в научной медицине. Одним из таких растений является люцерна посевная. Трава люцерны используется во многих странах для изготовления различных лекарственных препаратов, а также входит в состав многих биологически активных добавок (БАД). Однако биологически активные соединения данного растения, такие как полисахариды, в настоящий момент мало изучены.

Как известно, полисахариды обладают рядом фармакологических активностей: противовоспалительная, иммуномодулирующая, гиполипидемическая и другие. Исследование структуры полисахаридов может позволить определить функциональные сайты молекулы, ответственные за те или иные фармакологические свойства. В связи с развитием физико-химических методов анализа, полисахариды стали более доступны для изучения.

Среди важных спектроскопических методов, которые используются в настоящее время для установления структуры вещества, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР спектроскопия) — метод относительно новый. Для решения химических задач данный метод начал применяться с 50х годов прошлого века, и до сих пор имеет широкое применение. Принципиально отличие ЯМР спектроскопии от других методов состоит в том, что он позволяет определить расположение ядра в молекуле, температуру соединения, позволяет исследовать скорость и динамику химических процессов. Так же его можно использовать для исследования механизмов реакций.

В связи с изложенным выше, представляется актуальным изучить полисахариды люцерны посевной.

Цель работы: охарактеризовать структуру индивидуального полисахарида люцерны посевной методом ЯМР спектроскопии.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Выделение индивидуального полисахарида методом ионообменной хроматографии (с постколоночной дерриватизацией) из полисахаридного комплекса.

2) Определение мономерного состава индивидуального полисахарида методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

3) Характеристика структуры индивидуального полисахарида методом ЯМР спектроскопии.

# ПОЛУЧЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ

## Люцерна

Рисунок 1 — Люцерна посевная

Люцерна (рис. 1) — одна из древнейших культур. Сейчас люцерну посевную выращивают по всему миру. Она распространена на 5 континентах, более чем в 80 странах на площади свыше 35 млн га. Ее широко культивируют во всех районах субтропической и на юге умеренной зоны. Наибольшие

площади посевов сосредоточены в США, Аргентине, России, Индии и в странах Западной Европы. Люцерна (род Medicago) насчитывает более 60 видов. Самое широкое распространение получила люцерна посевная, или синяя (Medicago sativa L.).

Многолетнее кустовое растение высотой 50-170 см. Корневая система с цилиндрическим или веретенообразным главным корнем и сильно развитыми боковыми корнями. На корнях развиваются клубеньковые бактерии, усваивающие азот воздуха. Стебли ветвистые, с 10-20 междоузлиями, хорошо облиственные (около 50%). В кусте от 2 до 300 стеблей. Листья тройчатые, листочки длиной 1-2,5 см и шириной 0,3-1,5 см. Соцветие — многоцветковая кисть. Цветки обоеполые, синего цвета различной интенсивности. Бобы многосемянные, спирально закрученные (от 1,5 до 5 оборотов). Семена почковидные или фасолевидные, желтые с зеленым или бурым оттенком.

На богарных землях в год посева получают 1-2 укоса, в последующие годы — 2-4, а при орошении — до 7-10 укосов за год с интервалами между ними 25-35 дней. По питательной ценности люцерна равноценна клеверу, в надземной части растения содержится 19,3-21,3% протеина, до 3,6% жира в пересчете на сухую массу сырья. Немаловажным показателем питательной ценности люцерны является ее аминокислотный состав, который представлен 17 аминокислотами, а суммарное содержание незаменимых кислот составляет 38-40%.

В надземной части люцерны установлено содержание жирных кислот липидного комплекса, который представлен пальмитиновой, стеариной, олеиновой, линоленовой, линолевой и другими кислотами. Эфирное масло представлено широким набором альдегидов, кетонов и спиртов. Установлено присутствие в люцерне оксикоричных кислот: феруловая, ванилиновая, кофейная, п-кумаровая, протокатеховая. В надземной части люцерны содержатся витамины (C,B,D,E), органические кислоты (лимонная, янтарная, малоновая, яблочная) и минеральные вещества (K, Mg, P, Fe, Cu, Ca). В

люцерне посевной обнаружены флавоноидные соединения: флавоны (апигенин), флавонолы (рутин, гиперозид, кверцетин, кверцетрин).

Применение люцерны посевной в народной медицине

Известно, что различные виды рода люцерны широко используются в народном хозяйстве в качестве кормовых растений и являются прекрасными медоносами. Помимо этого, люцерна издавна применяется в народной медицине.

Врачи Древнего Китая, пропагандирующие традиционную медицину, назначали пациентам люцерну при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, а также в качестве средства, возбуждающего аппетит. Лекари Древней Индии (аюрведы) применяли это растение для снятия болей, связанных с воспалением суставов и отеками, а также для лечения щитовидной железы.

Арабы кормили люцерной лошадей, искренне веря, что они станут еще более быстрыми и выносливыми. Они называли богатые минералами листья люцерны al-fac-facah, что в переводе означает «прародитель всей пищи», тогда как испанцы сократили это слово до alfalfa, которое и по сей день является английской вариацией названия травы люцерны. В настоящее время надземная часть люцерны посевной используется в качестве БАДа и применяется как антидиабетическое, диуретическое средство, при рахите и ревматизме.

## Полисахариды

### Характеристика полисахаридов

Полисахаридами называют полимерные углеводороды, построенные из остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. Гликаны можно рассматривать как продукты поликонденсации моносахаридов и их производных, в состав молекул которых могут входить от 10 до нескольких тысяч остатков. Так как каждый моносахарид, входящий в состав полисахаридов, может иметь $\alpha$- или $\beta$-конфигурацию, находиться в

пиранозной или фуранозной форме, выделять для образования гликозидной связи одну или несколько гидроксильных групп, количество разнообразных полисахаридов, в теории, очень велико. Однако в природе реализована лишь небольшая часть имеющихся возможностей. В основном, природные полисахариды построены по относительно однообразной схеме.

Полисахариды могут быть построены из одного вида моносахаридов (гомополисахариды) или из двух и более (гетерополисахариды). Самыми распространенными моносахаридами, входящими в состав полисахаридов являются гексозы (глюкоза, галактоза, манноза) и пентозы (арабиноза, ксилоза). Так же в состав полисахаридов могут входить остатки уксусной, фосфорной и серной кислот. Они крепятся к гидроксильным группам, которые часто входят в состав полисахаридов.

Полисахариды составляют основную массу органического вещества на Земле и выполняют три важные биологические функции: стркутурную, резервную и защитную. Резернвные полисахариды, из-за их способности быстро гиролизоваться, являются для клетки источником энергии и метаболитов. Защитные полисахариды предохраняют клетку от высыхания. К ним относятся камеди высших растений, а так же гетерополисахариды сложного строения, которые образуют защитные капсулы микроорганизмов и водорослей. Полисахариды, выполняющие структурную функцию, служат армирующим материалом стенок клеток, обеспечивают эластичность клеточных стенок и межклеточную адгезию в тканях[].

В отличие от моносахаридов, полисахариды не имеют сладкого вкуса. Они хорошо растворимы в воде, в связи с большим количеством гидроксильных групп. Растворы гликанов отличаются от растворов низкомолекулярных соединений в связи с их высокой молекулярной массой. Полисахариды связывают большое количество растворителя, что делает макромолекулу более рыхлой и очень объемной.

В конце 70х годов японские ученые впервые показали иммуномодулирующую активность у полисахаридов, хотя предположения о

том, что полисахариды растений могут иметь фармакологическую активность высказывались еще в 60х годах. В настоящее время открыто огромное множество фармакологических свойств полисахаридов, начиная от снижения фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний, и заканчивая способностью полисахаридов связывать и выводить из организма человека тяжелые металлы, в том числе радионуклиды.

В связи со сказанным выше, изучение структуры полисахаридов и ее связь с фармакологическими свойствами является одной из перспективных задач современной науки[].

## Способы получения полисахаридов

Хотя и существует большое разнообразие методов получения полисахаридов, стандартную процедуру описать невозможно, так как существует ряд общих требований к проблеме выделения. Способ выделения должен соответствовать двум основным требованиям:

1) Максимальная эффективность процесса, обеспечивающая незначительные потери на всех стадиях;
2) Минимальное количество изменений, которым должен подвергаться полисахарид в процессе выделения;

Также при выделении полисахарида нужно решить несколько задач:

1) Отделение низкомолекулярных веществ;
2) Разделение смеси полисахаридов

Зачастую применяемый метод позволяет сразу несколько задач. Выбор способа выделения зависит от свойств полисахаридов.

### *Экстракция из растительного сырья*

Водорастворимые полисахариды получают экстракцией водными растворами из растительного сырья при комнатной температуре или нагревании. Повышение растворимости может быть достигнуто изменением значения pH растворителя. Чтобы определить оптимальное значение pH, при

котором не будет происходить разрушение полисахарида, необходимо проводить испытания на малых количествах сырья.

Осаждение этиловым спиртом поможет частично отделить низкомолекулярные вещества, решая тем самым одну из задач выделения полисахарида. Затем осадок растворяют в воде и очищают на ультрафильтрационной кассете, после чего подвергают лиофильной сушке. Лиофилизация – чрезвычайно ценный метод высушивания полисахаридов; в процессе лиофилизации эти вещества не ороговеют и не становятся химически инертными. Вещество получается легким, пушистым и за счет большой поверхности обладает высокой скоростью растворения.

### *Ионообменная хроматография полисахаридных комплексов*

После экстракции выделенные полисахариды находятся в комплексе. Наиболее успешным методом их разделения является ионнообменная хроматография. Ионообменниками обычно служат аниониты, полученные модификацией целлюлозы, например ДЭАЭ-целлюлоза. В ДЭАЭ-целлюлозе часть водородных атомов гидроксильных групп замещена диэтиламиноэтильными группами. В ионообменной хроматографии разделение компонентов смеси достигается за счет обратимого взаимодействия ионизирующихся веществ с ионными группами сорбента. Для элюирования полисахаридов с колонки используют растворы солей разной концентрации. Данный метод позволяет легко отделять кислые полисахариды от нейтральных. ДЭАЭ-целлюлоза является слабым ионообменником, что дает дополнительную избирательность при разделении.

Полисахариды в колонку вводят в виде водного раствора и вымывают в градиентном режиме. Определение концентрации полисахаридов в элюате можно определить реакцией с карбазолом. Данный метод решает одну из основных задач выделения полисахаридов – разделение смеси полисахаридов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Перед тем, как приступить к характеристике структуры индивидуального полисахарида, необходимо определить его мономерный состав, т.е. разделить полисахарид на составляющие его моносахариды. Данный результат может быть достигнут кислотным гидролизом полисахарида. Этот метод позволяет разорвать гликозидные связи в полисахариде. На выбор условий гидролиза влияет растворимость исходного полисахарида и устойчивость к кислотам освобождающихся при гидролизе моносахаридов. Однако, существуют условия, при которых гидролизуется большинство полисахаридов. Такие условия достигаются при нагревании в 2 н. серной кислоте при 100°С в течение 2-4 часов.

Идентифицируют моносахариды методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

### Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС)

Хроматография – это метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами, подвижной и неподвижной. Газовая хроматография – это хроматография, в которой в качестве подвижной фазы используется газ. Если в качестве неподвижной фазы выступает твердый сорбент, то метод называется газоадсорбционной хроматографией. Если же в качестве неподвижной фазы выступает газ, то метод называется газо-жидкостной хроматографией. В данном методе исследуемое вещество проходит по колонке в смеси с газом носителем. По мере прохождения через неподвижную фазу исследуемая смесь разделяется на отдельные составляющие путем многократного задерживания компонент смеси неподвижной фазой. Поскольку растворимость компонент смеси в

неподвижной фазе различна, время выхода их из колонки тоже будет отличаться.

Для исследования мономерного состава исследуемого вещества используется газо-жидкостная хроматография. Однако, данный метод находит ограниченное применение, так как возникает необходимость перевода исследуемого образца в летучие, устойчивые в условиях разделения, соединения. Для этого сахара переводят в триметилсилильные производные (ТМС). В качестве силилирующего агента используется N-(триметилсилил)имидазол и смесь его с пиридином. Данный реактив обладает хорошими растворяющими свойствами и может использоваться для силилирования влажных образцов сахаров. Так же данный метод увеличивает устойчивость триметилсилиловых эфиров. Стандартная калибровачная смесь устойчива в течении нескольких месяцев.

В качестве газа носителя в газо-жидкостной хроматографии используют азот или гелий. В качестве жидкой фазы используют различные силиконовые масла и полиэфиры.

Так как разные вещества удерживаются в колонке по-разному, на хроматограмме записываются отдельные сигналы для каждого вещества в соответствии с временем их нахождения в колонке. Далее вещество отправляется на детектор. Для газо-жидкостной хроматографии в качестве детектора используют масс-спектрометр.

## Масс-спектроскопия

Масс-спектрометрия – метод исследования вещества, основанный на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации представляющих интерес компонентов пробы. Масс-спектрометр состоит из трех основных частей: источника ионов, масс-анализатора и детектора. Так как масс-анализатор, детектор и большинство источников ионов требуют низкого давления, масс-спектрометр также должен

быть оснащен вакуумной системой. Кроме того, необходимо наличие системы регистрации сигнала, поступающего с детектора. В самом начале развития масс-спектрометрии запись спектров производилась на фотопластинах. Однако сейчас почти все приборы имеют компьютерную систему регистрации. Компьютеры также используются для обработки данных, например, для идентификации белков. Как правило, в сочетании с масс-спектрометром для предварительного разделения анализируемой смеси используются и другие приборы, например, хроматографы. Схема типичного масс-спектрометра представлена на рисунке 1.

Рисунок 1 Типичная схема масс-спектрометра

Для того чтобы получить масс-спектр, необходимо ввести образец в ионный источник масс-спектрометра, ионизировать молекулы (получить положительные или отрицательные ионы), разделить эти ионы по величинам *m*/*z* (отношение их массы к заряду) и установить число ионов с каждым *m*/*z*. Компьютер управляет всеми процессами и проводит обработку данных. Дополнительные узлы могут добавляться для решения более сложных задач.

Таким образом, масс-спектрометрия является аналитическим методом, оперирующим заряженными атомами и молекулами химических соединений. Принципиальным моментом является ионизация молекул образца или перевод ионов, уже имеющихся в растворе или в твердой матрице, в газовую фазу. Отношение массы к заряду (*m*/*z*) ионов может быть точно измерено, что

позволяет установить молекулярные массы ингредиентов образца. Можно также инициировать фрагментацию исходных молекулярных ионов с получением набора фрагментных ионов. Эти ионы представляют собой наиболее стабильные фрагменты исходной молекулы и позволяют делать выводы о ее структуре. Интенсивности и величины $m/z$ молекулярного и фрагментных ионов на графике по осям $y$ и $x$ соответственно называются масс-спектром. Обычно график нормализуется на 100 % по наиболее интенсивному пику в спектре. Масс-спектр — уникальная характеристика химического вещества. Для работы с масс-спектром необходимы только атомные массы химических элементов, точнее природных изотопов этих элементов. Поскольку атомные и молекулярные массы — простые и широко используемые характеристики, масс-спектры значительно проще для интерпретации, чем ЯМР, ИК, УФ, ЭПР и другие типы спектров.

Существуют определенные правила, определяющие направления фрагментации химических соединений в масс-спектрометре. Поэтому на основе масс-спектра можно установить молекулярную массу, элементный состав, присутствие определенных функциональных групп, а зачастую и полную структуру анализируемого вещества.

## Ввод образца

На этой стадии наиболее серьезная проблема связана с тем, что большинство приборов функционирует в условиях глубокого вакуума ($10^{-5}$—$10^{-6}$ торр). Существует несколько подходов: прямой ввод, ввод через полупроницаемую мембрану, интерфейсы с многочисленными хроматографами (ГХ, ВЭЖХ, СКФХ, КЭ) и даже самостоятельное натекание молекул или ионов из атмосферы в прибор, работающий в условиях пониженного давления. В случае прямого ввода жидкий или твердый образец

направляется в ионный источник через вакуумный шлюз. Поскольку обычное давление в источнике $10^{-5}$-$10^{-6}$ мм рт. ст., а образец может быть нагрет до 400 °C и более, значительное число органических соединений может быть переведено в газовую фазу и проанализировано.

Однако, если образец представляет собой смесь соединений с близкими летучестями, зарегистрированный масс-спектр будет представлять собой суперпозицию спектров компонентов. Этот факт может существенно усложнить процесс идентификации, причем как компьютеризованный, так и производимый вручную.

## Ионизация

Масс-спектрометрия регистрирует исключительно заряженные частицы. Ни молекулы, ни радикалы не могут быть исследованы в своей исходной нейтральной форме. Следовательно, молекулы образца должны быть ионизированы.

Роль источника ионов в масс-спектрометрии — получение газофазных ионов. Атомы, молекулы или кластеры исследуемых соединений переходят в газовую фазу и ионизируются или напрямую (как в электроспрее), или посредством каскада отдельных процессов (как, например, в тлеющем разряде). Выбор источника ионов зависит от задачи.

Все существующие методы могут быть грубо разделены на две группы: ≪мягкие≫ и ≪жесткие≫. Это разделение основано на величине избытка внутренней энергии в образующемся молекулярном ионе. Если эта величина мала, фрагментация незначительна и ион регистрируется как молекулярный. Такой процесс называется ≪мягкой ионизацией≫. Определенный избыток внутренней энергии запускает процесс разрыва конкретных химических связей в исходном молекулярном ионе, приводя к появлению различных фрагментных ионов. Иногда молекулярный ион вообще не удается зарегистрировать. Подобный процесс называется ≪жесткой≫ ионизацией.

Оба варианта полезны. Первый дает информацию о молекулярной массе соединения и его элементном составе (масс-спектрометрия высокого разрешения), второй позволяет получить структурную информацию благодаря массам фрагментных ионов.

### *Ионизация электронами*

Ионизация электронами (традиционно называвшаяся ≪электронным ударом≫), исторически была первым и до сих пор остается одним из наиболее востребованных методов ионизации. Она особенно важна для масс-спектрометрии образцов объектов окружающей среды. В процессе ионизации электронами (ИЭ) газообразные молекулы образца должны оказаться в ионном источнике, функционирующем в условиях высокого вакуума ($10^{-5}$—$10^{-6}$ мм рт. ст.). Испускаемые катодом электроны, пролетая через ионный источник к противоэлектроду, взаимодействуют с этими молекулами. В результате собственные электроны молекул переходят на более высокие орбитали или совсем покидают молекулу с образованием ионов. Процесс может быть представлен следующим уравнением:

$$M + \bar{e} = M^{+\cdot} + 2\bar{e} \qquad (1)$$

Источник ИЭ состоит из камеры с несколькими отверстиями (рис. 2). Исследуемые молекулы направляются в камеру. Электронный пучок формируется при нагревании катода, затем электроны пересекают камеру и собираются на коллекторе. Магниты обеспечивают винтовые траектории электронов в целях увеличения их пути и, следовательно, вероятности взаимодействия электронов с анализируемыми молекулами.

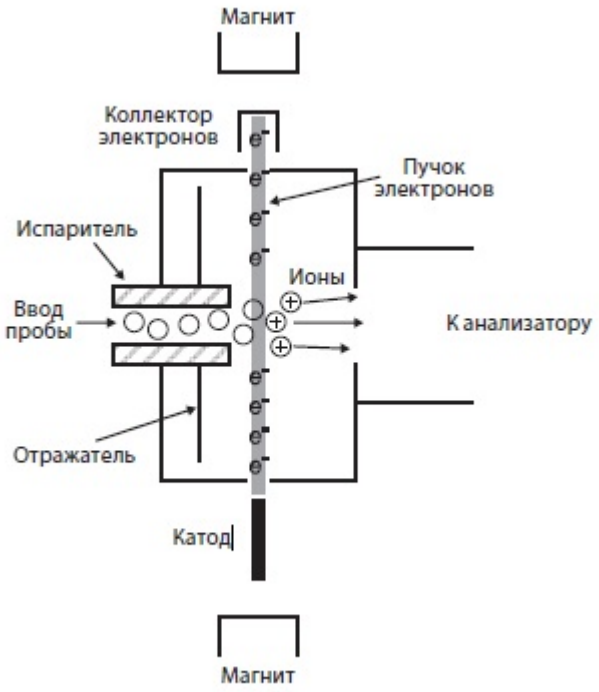



Рисунок 2 Схема источника с электронной ионизацией

Так как масса электронов намного меньше массы ионов, ионы не подвергаются влиянию типичного для ИЭ магнитного поля. При взаимодействии электрона с молекулой один (или более) собственных электронов удаляется из молекулы. Если исследуемые молекулы имеют высокое сродство к электрону, при присоединении электрона могут образовываться отрицательные ионы, однако использование отрицательных ионов в данном источнике имеет некоторые ограничения. В режиме положительных ионов энергия электронов обычно составляет 70 эВ, что соответствует максимуму сечения ионизации для большинства молекул. Выход молекулярных ионов близок к максимуму, но в то же самое время образуется широкий круг интенсивных фрагментных ионов, которые могут быть использованы для определения структуры соединения. Обычно ввод образца регулируется таким образом, чтобы свести к минимуму вероятность протекания ионно-молекулярных реакций. Даже принимая во внимание нежелательность интенсивной фрагментации, следует отметить, что масс-спектр ИЭ может использоваться как характеристика данной молекулы. Более

того, так как спектры ИЭ относительно воспроизводимы и не зависят от прибора, были созданы представительные библиотеки таких спектров, использующиеся для идентификации соединений. Фрагментация может быть уменьшена понижением энергии электронов, но при этом значительно снижается и эффективность ионизации. Источник ИЭ генерирует непрерывный пучок ионов, так что он идеально совместим с квадрупольными и магнитными секторными приборами, однако и другие типы анализаторов могут использоваться. ИЭ, как правило, применяется для ГХ-МС-анализа органических молекул.

### *Полевая ионизация*

Еще одним популярным ≪мягким≫ методом является полевая ионизация. Само явление было открыто Е. Мюллером в 1951 году. Он создал полевой ионный микроскоп, наблюдая за появлением катионов вблизи металлической поверхности в сильном электростатическом поле. Через несколько лет источник ПИ был использован в масс-спектрометре. Тем не менее успешное внедрение ПИ в систему ГХ/МС произошло только 20 лет спустя. Метод основан на эффекте туннелирования электрона. Ионизация происходит, когда молекула образца в газовой фазе оказывается вблизи эмиттера, к которому приложен очень высокий потенциал (8—10 кВ). В качестве эмиттера обычно используются острые металлические поверхности (лезвие бритвы, острие иглы) или острые иголочки, образующиеся при пиролизе бензонитрила. Кривизна поверхности приводит к очень высоким значениям плотности электрического поля (~1 В/А). В результате электрон молекулы анализируемого вещества туннелирует с образованием катион-радикала практически без избытка внутренней энергии. Помимо того, этот катион не может долго находиться рядом с положительно заряженным эмиттером (8—10 кВ) и выталкивается из источника за 10—12 с, т. е. в 106 раз быстрее, чем в случае ЭИ. Фрагментация оказывается практически

невозможной, а масс-спектр очень часто состоит исключительно из пика молекулярного иона. Если образец наносится непосредственно на поверхность эмиттера при атмосферном давлении, а затем эмиттер вводится в ионный источник и на него подается напряжение, протекает аналогичный процесс ионизации, а метод называется полевой десорбцией.

Механизм в этом случае связан с туннелированием электрона из твердофазного образца с последующей десорбцией с эмиттера образовавшегося иона. Некоторое время назад казалось, что ПИ утратила свое значение, но недавно появившиеся приборы, способные попеременно снимать масс-спектры ЭИ и ПИ, вдохнули новую жизнь в этот метод.

### *Электрораспыление*

В ЭРИ проба растворяется в полярном и летучем буфере и вводится через иглу, находящуюся под высоким напряжением (положительным или отрицательным относительно входного отверстия масс-спектрометра). Высокое напряжение (1…4 кВ) приводит к формированию конуса Тэйлора, обогащенного положительными или отрицательными ионами. Поток заряженных частиц экстрагируется из конуса Тэйлора благодаря наличию электрического поля. Капли уменьшаются в размере вследствие процесса испарения, усиленного потоком теплого азота, со направленного потоку пробы (рис. 3). Ионы образуются при атмосферном давлении и поступают через канал конической формы в область промежуточного вакуума, а оттуда через небольшое отверстие — в область высокого вакуума масс-анализатора. ЭРИ может работать со всеми распространенными типами анализаторов. Точный механизм образования ионов из заряженных капель все еще не полностью раскрыт, и существуют различные теории этого процесса.

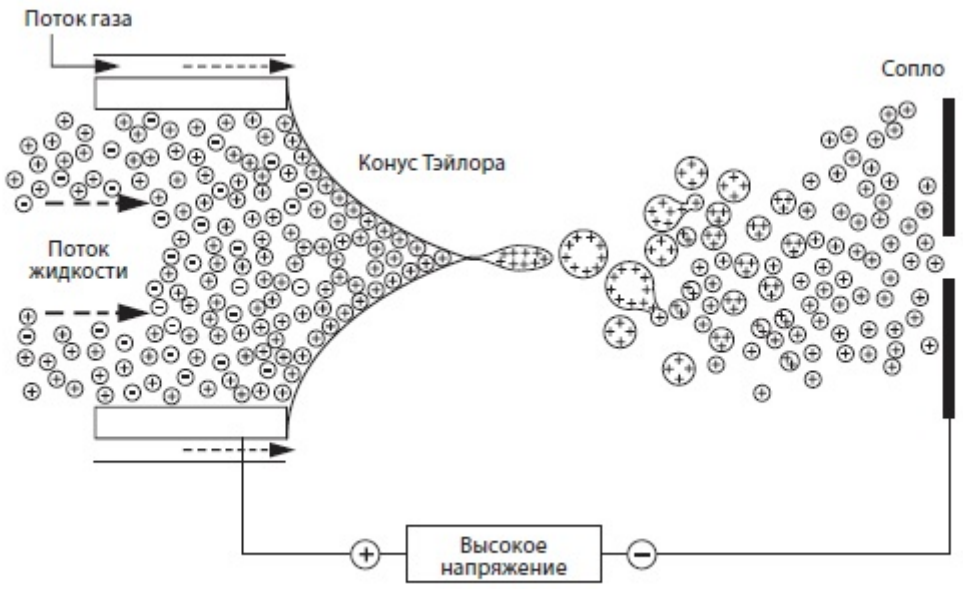



Рисунок 3 Схема электрораспылительного источника

Пробоподготовка для ЭРИ требует только растворения образца до подходящей концентрации в смеси воды с органическими растворителями: как правило, метанолом, изопропанолом и ацетонитрилом. Небольшие концентрации муравьиной или уксусной кислот часто используются для усиления протонирования. В режиме регистрации отрицательных ионов, чтобы инициировать депротонирование, принято добавлять растворы аммиака или летучих аминов. Чувствительность ЭРИ очень высока — пределы обнаружения для многих пептидов составляют несколько фемтомолей или даже аттомоли. Однако чувствительность ЭРИ является функцией концентрации. Например, при потоках от 1 до 1000 мкл/мин обычные ЭРИ-источники потребляют очень много пробы. Поэтому преимущество имеют низкие потоки. Нано-ЭРИ (или наноспрей) — это версия с низкими скоростями потоков (20…200 нл/мин) соответственно, с низким расходом пробы и значительно более высокой чувствительностью. Наноэлектроспрей также оказался более устойчивым к присутствию солей, чем обычный электроспрей. При соединении ЭРИ с капиллярным электрофорезом были детектированы доли аттомолей. ЭРИ-МС может быть использована для

анализа полярных молекул в диапазоне от менее чем 100 Да до масс целого вируса (более 2 МДа) и даже 100 МДа (одиночный ион ДНК). Важным свойством ЭРИ является способность генерировать распределение многозарядных ионов, что позволяет использовать масс-анализаторы с ограниченным диапазоном масс. Незначительные изменения условий анализа, такие как pH, состав растворителя, концентрация солей, частичная денатурация анализируемых молекул, могут изменить зарядовое распределение для больших молекул. Многолинейчатый спектр многозарядных ионов делает интерпретацию ЭРИ-спектров сложных смесей затруднительной. На практике для преобразования таких спектров в спектр единичных ионов с соответствующими молекулярными массами и нулевым зарядом используются компьютеры.

### *Вторично-ионная масс-спектрометрия*

Соударение первичного иона с поверхностью, инициирует каскад столкновений с атомами поверхности, что ведет к испусканию нейтральных молекул и ионов посредством так называемого распыления (рис. 4). Приложения ВИМС можно разделить на две основные области: статическая ВИМС, когда объектом анализа является поверхность образца, и динамическая ВИМС, когда анализируется профиль пробы по глубине. При статической ВИМС облучение пробы невелико (полная доза — менее $10^{13}$ ионов/см$^2$), поэтому повреждением поверхности можно пренебречь. Времяпролетный анализатор больше других подходит для статической ВИМС, обладающего пространственным разрешением в доли микрона.

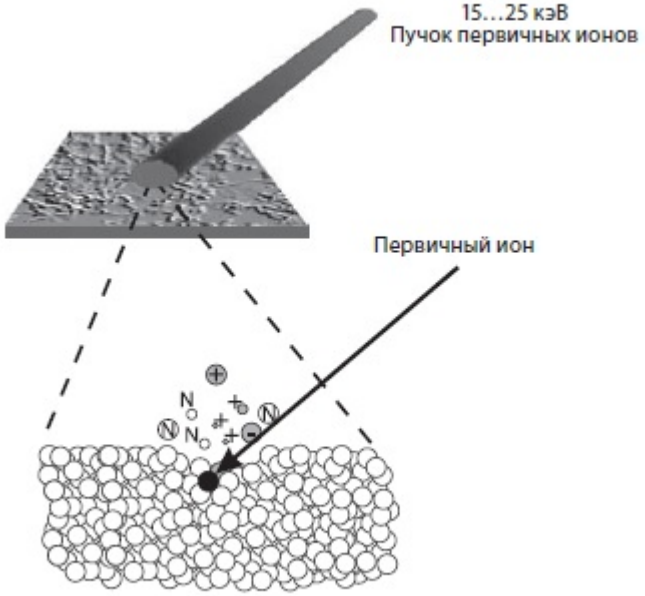



Рисунок 4 Схема распыления в ВИМС

Динамическая ВИМС, с другой стороны, использует тот факт, что материал десорбируется только с поверхности. В динамической ВИМС большая часть информации о молекулярных ионах теряется, но могут детектироваться атомы и небольшие молекулы. Так как динамическая ВИМС с непрерывным первичным ионным пучком намного быстрее, чем динамическая ВИМС с импульсной подачей первичных ионов, в этом случае используются квадруполи и магнитные секторные анализаторы.

В ВИМС анализируемые ионы (то есть вторичные ионы) образуются при облучении поверхности непрерывным или импульсным пучком первичных ионов (рис. 4). Первичные ионы, как правило, однозарядные с кинетической энергией в несколько десятков килоэлектронвольт, однако существуют и источники с энергиями первичных ионов менее 1 кВ.

### Масс-анализаторы

После того как ионы образца получены, необходимо их разделить. Для этой цели используются масс-анализаторы. Существует несколько типов анализаторов. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки.

### *Секторные приборы*

Исторически магнитные секторные приборы были первыми масс-спектрометрами. Эти приборы могут иметь один магнитный анализатор или несколько магнитных и электростатических анализаторов. Чем больше анализаторов имеет масс-спектрометр, тем более сложные исследования могут осуществляться с его помощью. Схема секторного масс-спектрометра прямой геометрии с двойной фокусировкой (магнитный анализатор следует за электростатическим) представлена на рисунке 5. Покидая источник, ионы ускоряются по направлению к анализаторам.

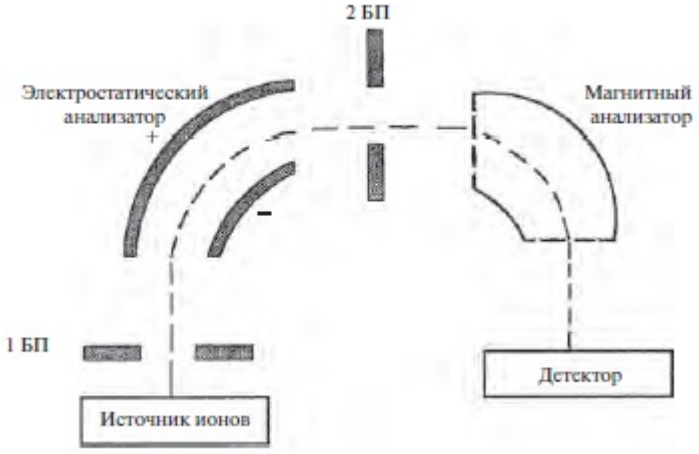



Рисунок 5 Принципиальная схема двухфокусного масс-спектрометра (прямая геометрия). БП — бесполевое пространство

Уравнение разделения ионов в магнитном секторе:

$$\frac{m}{ze} = \frac{B^2R^2}{2V} \qquad (2)$$

где $m$ — масса иона, $e$ — элементарный заряд, $z$ — число зарядов, $B$ — напряженность магнитного поля, $R$ — радиус магнита, $V$ — ускоряющее напряжение (обычно несколько кВ). Таким образом, магнитный анализатор может разделять ионы по их значениям $m/z$ при изменении напряженности поля, радиуса или ускоряющего напряжения, причем предпочтительно изменять именно напряженность поля. Электростатический сектор называется

анализатором ≪энергий≫, поскольку пропускает только ионы с определенной кинетической энергией (в обычном режиме напряжение электростатического поля равно ускоряющему напряжению). Объединение в приборе двух и более анализаторов позволяет проводить тандемные масс-спектрометрические эксперименты. Помимо этого, электростатический анализатор привносит дополнительную особенность — высокую разрешающую способность (разрешение по массе). Разрешение по массе ($R$) означает способность масс-спектрометра разделять два иона с массами $m$ и ($m + \Delta m$). Формально для двух соседних пиков однозарядных ионов равной интенсивности (рис. 5) разрешающая способность определяется как $R = m/\Delta m$. Другой часто используемый термин ≪разрешение по массе≫ определяется как $\Delta m$. Если $\Delta m = 1$, то $R$ — теоретический предел измеряемой массы на приборе (когда еще возможно увидеть два разделенных сигнала от соседних ионов целочисленной массы). Единичное разрешение означает, что масс-спектрометр позволяет разделять ионы с точностью до целочисленных масс. Например, разрешающей способности 1000 достаточно для разделения ионов с $m/z$ 999 и $m/z$ 1000. Рисунок 6 иллюстрирует определение разрешающей способности (10%-я ложбина). Следует отметить, что для разрешающей способности других анализаторов обычно пользуются 50%-й ложбиной.

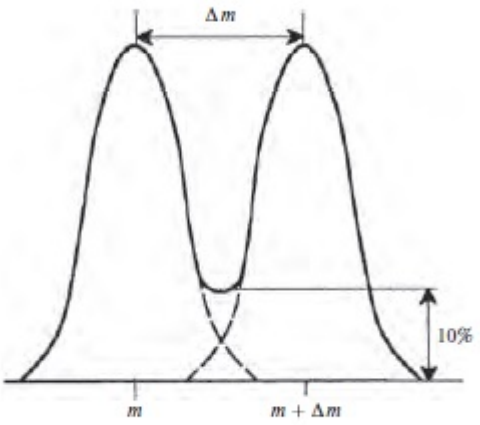



Рисунок 6 Определение разрешающей способности спектрометра

Установление элементного состава соединения, содержащего любые химические элементы, за пару минут — важное преимущество масс-спектрометрии над трудоемким определением состава с помощью классического элементного анализа. Тем не менее следует отметить, что элементный анализ дает информацию о составе всего образца (включая примеси), тогда как масс-спектрометрия устанавливает элементный состав индивидуальных соединений (отдельно всех компонентов и примесей образца).

Разрешение по массе не является синонимом точности измерения массы. Первый из этих параметров определяет способность масс-спектрометра получить раздельные изображения (пики) ионов с близкими массами, а второй — установить точное и правильное значение $m/z$ иона, обычно для последующего определения его элементного состава. Не стоит думать, что увеличение разрешения всегда ведет к автоматическому улучшению точности измерения масс. Как только разрешение оказывается достаточным для разделения пиков измеряемых ионов, бессмысленно увеличивать его далее, поскольку интенсивность сигналов будет уменьшаться с неизбежным уменьшением точности измерений масс.

Измеряя массы с очень высоким разрешением, фактически можно измерять энергии. Работает знаменитое уравнение Эйнштейна $E = mc^2$. В частности, энергия связи, складывающаяся из сильных, слабых и электромагнитных взаимодействий, может быть определена при измерении масс всей молекулы и ее составляющих. Возвращаясь к секторным масс-спектрометрам, следует отметить следующие аспекты. Современные приборы этого типа обладают великолепным разрешением по массе, точностью измерения масс, чувствительностью, а также надежностью количественного определения. Их динамический диапазон остается непревзойденным, а диапазон измеряемых масс уступает только времяпролетным приборам. К недостаткам этих анализаторов можно отнести небольшую скорость сканирования и достаточно большие размеры.

*Квадрупольные приборы*

Прорыв масс-спектрометрии в область экологии произошел в 1970-х с внедрением квадрупольных приборов в широкую практику. Это устройство часто называют фильтром масс. Оно состоит из четырех параллельных стержней (рис. 7), к которым приложено переменное и постоянное напряжения, создающие квадрупольное поле, способное фокусировать, удерживать и анализировать ионы.

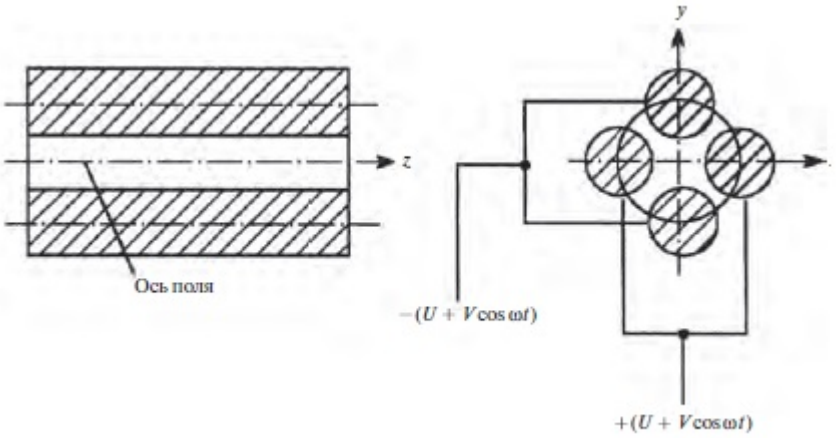



Рисунок 7 Принципиальная схема квадрупольного анализатора

Низкая стоимость, небольшие размеры, высокая скорость сбора данных, хороший динамический диапазон, хорошая воспроизводимость и пониженные требования к вакуумной системе являются основными достоинствами квадрупольных масс-спектрометров. Благодаря этим характеристикам даже невысокое разрешение по массе не остановило активного продвижения квадруполей на приборный рынок. Поскольку молекулярные массы подавляющего большинства приоритетных загрязняющих веществ редко превосходят 500 Дальтон, квадрупольные масс-спектрометры с разрешающей способностью 1000 оказались идеальным инструментом для качественного и количественного определения этих соединений в самых разнообразных

образцах. Неплохая чувствительность квадруполей в режиме сканирования может быть увеличена примерно в 100 раз при работе в режиме масс-фрагментографии. Комбинация трех квадруполей (QqQ) позволяет использовать несколько режимов тандемной масс-спектрометрии. Этот подход активно применяется в настоящее время для надежной идентификации и количественного определения загрязняющих веществ и природных соединений, включая пептиды и белки.

Использование ≪мягкого≫ метода ионизации (например, электрораспыление) дает возможность получить молекулярные ионы компонентов смеси. Молекулярные ионы каждого типа (рис. 8, белые, розовые или зеленые шарики) по очереди проходят через первый квадруполь и направляются к следующему анализатору (Q3).

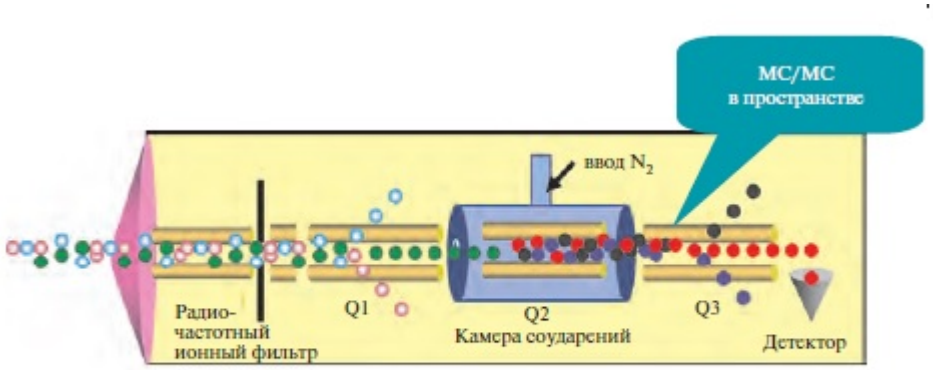



Рисунок 8 Схема эксперимента МС/МС в пространстве.

На пути следования они попадают в специальную ячейку (Q2), в которой их внутренняя энергия повышается каким-либо образом для того, чтобы инициировать их фрагментацию. Существует достаточно много реакций активации, хотя соударение с атомами инертного газа остается наиболее популярным процессом. Фрагментные ионы (синие, красные и черные шарики) исходного молекулярного иона (зеленые шарики) достигают второго анализатора, в котором они разделяются по $m/z$, т. е. происходит регистрация масс-спектра первого компонента образца. Далее процедура повторяется со

вторым молекулярным ионом (например, розовые шарики) и так далее. Когда будет осуществлена фрагментация всех молекулярных ионов, анализ образца без его предварительного разделения будет завершен. Обычно такой режим занимает значительно меньше времени, чем, например, ГХ/МС или ЖХ/МС. Очевидным недостатком является невозможность анализировать изомеры.

### *Ионные ловушки*

Впервые ионная ловушка в качестве устройства для удерживания ионов была предложена Паулем в 1953 году. Существует много разных ионных ловушек: квадрупольные, цилиндрические, линейные и т. д. Принцип работы наиболее популярной цилиндрической ловушки мало отличается от такового для квадруполя. Разница заключается в геометрии. Обычно ловушки состоят из двух торцевых и одного кольцевого электрода, которые создают рабочий объем для экспериментов с ионами.

Ловушки оказались еще дешевле и меньше по размеру, чем квадруполи. Более того, сложные тандемные эксперименты могут осуществляться в любой ионной ловушке, а при использовании низкой скорости сканирования разрешающая способность этих приборов может достигать 107. Кстати, МС/МС-эксперименты в ионных ловушках называются МС/МС во времени в противоположность МС/МС в пространстве в тройных квадрупольных и магнитных секторных приборах. Эти особенности сделали ионные ловушки вполне конкурентоспособными квадруполям, несмотря на меньший динамический диапазон и ухудшенные характеристики количественного анализа. Они отлично зарекомендовала себя в качестве устройства для инициирования фрагментации в режиме МС/МС.

### *Времяпролетные масс-спектрометры*

Возьмем полую трубу, а ионы с разными значениями *m*/*z* находятся на стартовой линии около входа в эту трубу. Если, приложив потенциал (V), мы ускорим одновременно все эти ионы, они полетят по трубе, причем их кинетическая энергия будет одинаковой.

$$eV = \frac{mv^2}{2} \text{ или } m = \frac{2eV}{v^2} \quad (3)$$

Это означает, что более тяжелые ионы достигнут конца трубы позже, чем более легкие. Это основной принцип времяпролетной масс-спектрометрии. Разрешающая способность современных времяпролетных масс-спектрометров достигает сотен тысяч, они обладают высокой точностью измерения масс, теоретически неограниченным диапазоном масс. Их чувствительность достаточно высока, а скорость сбора данных непревзойденная.

Благодаря единовременному старту ионов со всеми значениями *m*/*z* к детектору масс-спектры оказываются идентичными вне зависимости от того, в какой части хроматографического пика они были зарегистрированы. Это важное преимущество времяпролетных анализаторов по сравнению с другими масс-спектрометрами. Времяпролетные приборы могут применяться для МС/МС-экспериментов.

## Детектирование ионов

Конечный блок масс-спектрометра отвечает за детектирование ионов. В первых классических приборах использовалась фотопластинка. Ионы с одинаковым значением *m*/*z* попадали на конкретный участок фотопластинки, а уровень засвечивания позволял проводить количественные измерения.

Токи ионов с одной величиной *m*/*z* в конкретном эксперименте очень малы ($10^{-9}$—$10^{—17}$ А) для прямого измерения. Поэтому детектированию предшествует процедура усиления сигнала. Умножители генерируют вторичные токи, более мощные в 104—108 раз. Когда ион проходит

анализатор и попадает в детектор, он инициирует эмиссию вторичных частиц, например, фотонов или электронов. Детекторы конвертируют энергию входящих частиц в ток, который измеряется соответствующими устройствами.

Электронные умножители могут быть разделены на две основные группы: с дискретным динодом (несколько раздельных динодов) и непрерывным динодом (непрерывная эмиссионная поверхность с высокой способностью ко вторичной эмиссии, например, мультиканальная пластина).

Для регистрации отрицательных ионов на первой стадии регистрирующей системы находится конверсионный динод. Отрицательный ион, попадая на этот динод, генерирует разные частицы, включая положительные ионы, которые регистрируются далее обычным образом.

## ЯМР спектроскопия

Одной из главных проблем в современной органической химии является определение структуры вещества. Для решения данной проблемы существует несколько методов. Во всем разнообразии методов по определению структуры вещества особняком стоит метод ЯМР спектроскопии. Для решения химических задач данный метод начал применяться с 50х годов прошлого века, и до сих пор имеет широкое применение.

Принципиально отличие ЯМР спектроскопии от других методов состоит в том, что он позволяет определить расположение ядра в молекуле, температуру соединения, позволяет исследовать скорость и динамику химических процессов. Так же его можно использовать для исследования механизмов реакций.

Суть спектроскопии ядерного магнитного резонанса состоит в поглощении ядром атома энергии магнитного поля. По квантовой теории ядро атома, имеющего магнитный момент, в магнитном поле поглощает только определенный уровень энергии. Следовательно, можно подобрать такую

частоту внешнего переменного магнитного поля, при которой атом начинает поглощать. Для каждого ядра этот уровень энергии свой.

## Квантовомеханическая модель изолированного протона

Некоторые ядра имеют магнитный момент μ, который обусловлен угловым моментом *P*. Как известно, две эти величины связаны соотношением:

$$\mu = \gamma P \tag{1.1}$$

где $\gamma$ - гиромагнитное отношение. Так как в квантовой теории магнитный момент ядра квантован, то собственные значения проекции *P* на ось z определяются:

$$P_z = \hbar m_I \tag{1.2}$$

где $m_I$=*I, I-1,...,-I* – магнитное квантовое число, *I* – спиновое квантовое число ядра. Таким образом, число возможных $P_z$ состояний 2*I*+1. В дальнейшем, для простоты задачи, будем рассматривать ядро атома водорода (протон). Данное ядро имеет спиновое квантовое число *I*=1/2. Тогда из (1.2) следует, что:

$$P_z = \pm\hbar/2 \tag{1.3}$$

При подстановке (1.3) в (1.1) получим:

$$\mu_z = \pm\gamma\hbar/2 \tag{1.4}$$

В связи с этим протон представляют как магнитный диполь,$\mu_z$ которого может быть направлена как по направлению магнитного поля, так и против. Квантование $\mu_z$ можно наблюдать на рисунке 1.1,а.

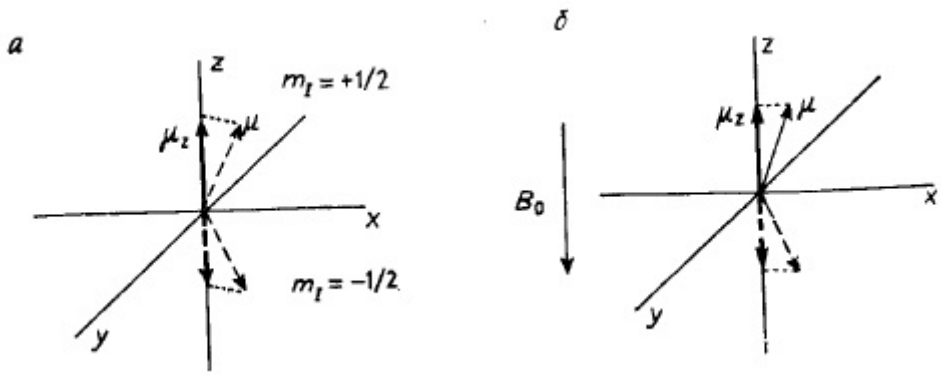


Рисунок 1.1 *а*—квантование магнитного момента; *б* — магнитный момент ядра ( $I = 1/2$) в магнитном поле $B_0$

Так же уравнение (1.4) записывают в виде:

$$\mu_z = \mu_N g_N m_I \tag{1.5}$$

где $g_N$ - g-фактор протона, $\mu_N$ - ядерный магнетон.

$$\mu_N = e\hbar/2\pi m_p \tag{1.6}$$

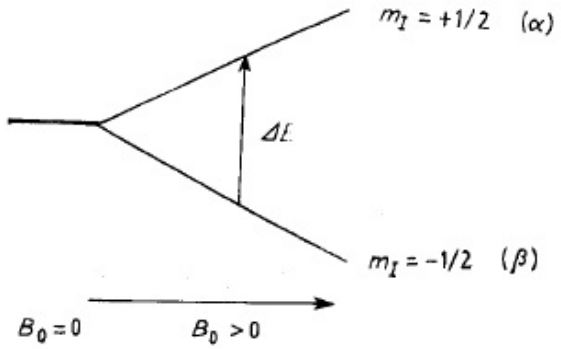



Рисунок 1.2 Расщепление энергетических уровней протона в магнитном поле

В квантовой механике полное состояние системы описывается волновой функцией $\psi$, котрая находится из решения стационарного уравнения Шредингера (УШ). Для дальнейшего упрощения введем собственные функции$\alpha$ и $\beta$. $\alpha$ будет соответствовать состоянию $m_I$=+1/2, а $\beta$ будет соответствовать $m_I$=-1/2. Состояния $\alpha$ и $\beta$- вырожденные состояния. Это значит, что они соответствуют одной и той же энергиии. Вырождение данных состояний легко снимается, если поместить протон в однородное магнитное поле $B_0$, которое совпадает по направлению с осью z. В этом случае можно наблюдать расщепление одного энергетического уровня на два. В этом случае разность энергии между двумя уровнями будет определяться как:

$$\Delta E = 2\mu_z B_0 \tag{1.7}$$

Отсюда можно сделать вывод, что разность между энергиями уровней прямопропорционально зависит от величины магнитного поля. Так как любая

система стремится к минимуму энергии, протон вероятнее будет занимать $\beta$ уровень.

### Условие резонанса

В зависимости от спинового числа $I$ может происходить ращепление энергетического уровня более чем на два. В соответствии с правилом отбора разрешены только те переходы, в при которых $m_I$=$\pm 1$. Чтобы вызвать такой переход необходим квант энергии $E = h\nu$. Из уравнения (1.7) энергия кванта должна быть равна:

$$h\nu_0 = 2\mu_z B_0 = \gamma\hbar B_0 \quad (2.1)$$

Данное выражение можно переписать:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (2.2)$$

Переходы для которых выполняется $m_I$=$\pm 1$ создают перпендикулярное к полю $B_0$, поляризованное по кругу излучение. Отсюда следует вывод, чтобы вызвать такие переходы, нужно излучение, в котором вектор магнитной индукции поляризован по кругу в плоскости, перпендикулярной в постоянному магнитному полю. Условие такой поляризации выходит из классической теории. Если магнитный диполь поместить в магнитное поле,как показано на рисунке 2.1, то он будет прецессировать вокруг постоянного магнитного поля $B_0$. Если приложить дополнительное магнитное поле$B_1$, то на диполь будет действовать пара сил $[\mu B_1]$, которая, при синхронном вращении поля $B_1$ вокруг поля $B_0$, будет будет непрерывно увеличивать угол $\Theta$. Если

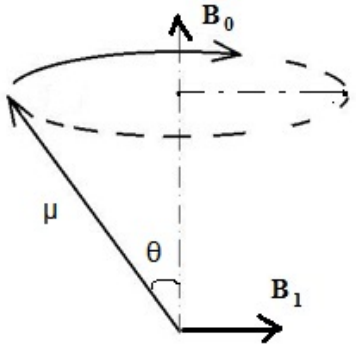



Рисунок 2.1 Схематическое изображение Ларморовской прецессии

вращение поля $B_1$ будет не синхронным, то будут происходить лишь небольшие возмущения угла Θ. Отсюда можно сделать вывод, что резонанс наступает при вращении поля с частотой ларморовской прецессии

$$2\pi\nu = \omega_0 = \gamma B_0 \qquad (2.3)$$

Совпадение классического и квантового представления позволяет гораздо проще описывать явление ядерного магнитного резонанса. Выражения (2.2) и (2.3) описывают *условие резонанса*, при котором частота излучения точно соответствует энергетической щели.

## Принципы работы спектрометра ЯМР и его особенности

Схема спектрометра ЯМР приведена на рисунке (4.1). Исследуемый образец помещают в стеклянную трубку, после чего трубка с образцом помещается между полюсами магнита в датчик спектрометра. Далее образец подвергается воздействию электромагнитного излучения с изменяющейся частотой. Ядра образца возбуждаются тогда, когда наступает резонансная частота.

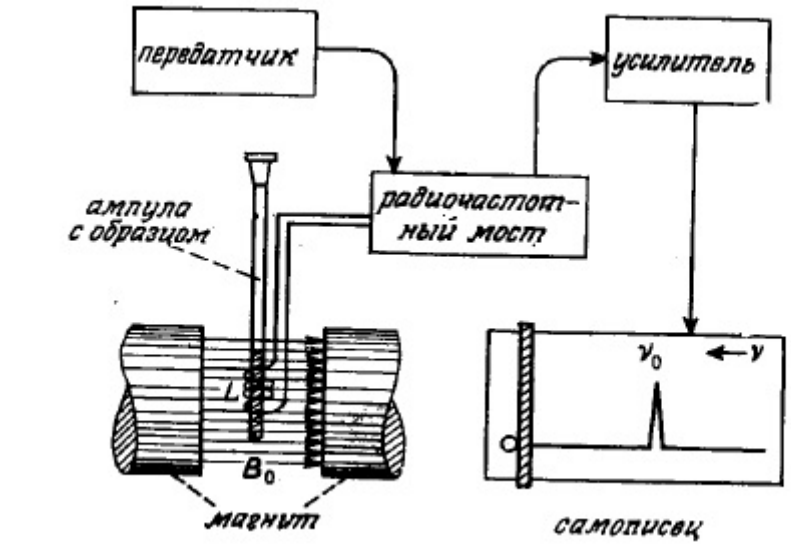



Рисунок 4.1 Схема спектрометра ЯМР

Поглощение ядрами энергии регистрируется с помощью радиочастотного моста. Далее зарегистрированный сигнал выводится на

усилитель, после чего попадает на самописец. Самописец записывает спектр, по которому потом методом калибровки можно определить резонансную частоту.

Так как спектрометр ЯМР включает в себя все элементы оптического спектрометра (источник излучения, ячейка с образцом, детектор) нужно отметить несколько отличительных особенностей спектрометра ЯМР. Во-первых, отсутствие необходимости в призме развертки спектра, так как катушка $L$ генерирует практически монохроматичное излучение. Во-вторых, нужно помещать образец в тех условиях, при которых он не может поглощать энергию.

В-третьих, имеет значение фазовое состояние образца. Это обуславливается тем, что в твердых телах существует взаимодействие магнитных моментов ядер друг с другом. Обозначим расстояние между магнитными моментами ядер за $r$. Пусть прямая, соединяющая их, составляет с магнитным полем $B_0$ угол $\theta$. Тогда изменение локального магнитного поля в местах расположения атомов из-за их взаимодействия:

$$\Delta B = \pm\left(\frac{3}{2}\right)\mu(3cos^2\theta - 1)r^{-3}\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \qquad (4.1)$$

В жидкостях и газах этого изменения не происходит, так как из-за хаотичного движения часть $(3cos^2\theta - 1)$ можно усреднить до нуля. В этом случае можно говорить о *спектроскопии ЯМР высокого разрешения.*

Из выражения (4.1) видно, что есть угол$\theta$ будет составять 54,7º(так называемый «магический» угол), то дипольные взаимодействия между ядрами исчезнут. Поэтому, теоретически, если быстро вращать кристалл вокруг оси, которая составляет с полем угол $\theta$=54,7º, то можно избавится от$\Delta B$ в твердых телах.

Следует отметить, что достижения условия резонанса можно добиться двумя путями: частотной и полевой разверткой. При *частотной развертке* изменяется частота, при неизменном значении напряженности магнитного

поля. При *полевой* же, наоборот, частота остается неизменной, при изменяющейся напряженности магнитного поля.

## Спиновые взаимодействия

### *Спин-решеточное время релаксации*

Для упрощения рассмотрения спин решеточного времени релаксации предположим, что ядерное спиновое число равно ½, система состоит из одинаковых атомных ядер и связь между ядерными магнитными моментами практически отсутствует. Допустим существование связи между ядрами. Система ядер находится в равновесии при температуре $T_s$. Здесь вещество, содержащее ядерные магнитные моменты, мы будем называть «решетка» вне зависимости от того, в каком агрегатном состоянии оно находится. Если на систему воздействовать полем резонансной частоты, то начнутся переходы между двумя энергетическими уровнями, вероятность которых можно описать элементарной теорией коэффициентов Эйнштейна. Из этой теории следует, что вероятность переходов на более высокий уровень равна вероятности перехода на нижний уровень. Вероятность спонтанного перехода по сравнению с ними ничтожно мала. На практике же, при температуре $T_s$, число атомов на нижнем уровне выше, чем на верхнем. Их отношение равно фактору Больца $\exp(\frac{2\mu B_0}{kT_s})$. Из-за этой разности населенности энергетических уровней происходит поглощение энергии магнитного поля. Если система ядерных спинов не взаимодействует с решеткой, то избыток населенностей постоянно уменьшается. В этом случае можно отдельно говорить о «температуре спинов» и о «температуре решетки». В реальности взаимодействие спинов и решетки

существует. Поэтому радиочастотное поле стремится уменьшить избыток на нижнем уровне, а спин-решеточное взаимодействие стремится вернуть этот избыток в начальное состояние. Предположим, что в начальном состоянии имело место быть равенство спиновой и решеточной температур. После наложения высокочастотного поля температура системы спинов увеличится. Найдем время, за которое система снова достигнет равновесия после отключения поля. Достижение равновесия должно происходить за счет переходов с верхнего уровня на нижний. На первый взгляд это должно противоречить утверждению о том, что переходы снизу вверх и сверху вниз равновероятны. Покажем, что это не так. Пусть число ядер в состоянии $m$=-1/2 равно $N_\beta$, а число ядер в состоянии $m$=+1/2 равно $N_\alpha$.Запишем уравнение теплового баланса:

$$W_\alpha N_\alpha = W_\beta N_\beta \tag{5.1}$$

где $W_\alpha$ и $W_\beta$ – соответствующие вероятности перехода. При равновесии отношение числа атомов на нижнем уровне к числу атомов на верхнем уровне равно фактору Больцмана:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp(\frac{2\mu B_0}{kT}) \tag{5.2}$$

Можно записать:

$$W_\beta = W(1 + \frac{\mu B_0}{kT}) \tag{5.3}$$

$$W_\alpha = W(1 - \frac{\mu B_0}{kT}) \tag{5.4}$$

$W$ – среднее значение двух вероятностей $W_\alpha$ и $W_\beta$.

Если температура спинов отлична от температуры решетки, то скорость изменения избытка числа ядер $n$=$N_\alpha$-$N_\beta$будет:

$$\frac{dn}{dt} = 2W_\beta N_\beta - 2W_\alpha N_\alpha \tag{5.5}$$

Подставив (5.3) и (5.4) получим

$$\frac{dn}{dt} = 2W(n_0 - n) \tag{5.6}$$

где

$$n_0 = \frac{N\mu B_0}{kT} \tag{5.7}$$

Проинтегрируем (5.6) в пределах от$n_a$ до $n$

$$n_0 - n = (n_0 - n_a)e^{-2Wt} \tag{5.8}$$

где $n_a$ - начальное значение $n$.

Из выражения (5.8) видно, что система приближается к равновесию экспоненциально. Время достижения равновесия при этом:

$$T_1 = \frac{1}{2W} \tag{5.9}$$

Процесс установления равновесия между системой спинов и решетки называется термическим релаксационным процессом, а время установления равновесия $T_1$ называется *спин-решеточным временем релаксации* или *термическим временем релаксации*.Так же это время называют *продольным временем релаксации.*

### *Спин-спиновое взаимодействие*

Исследуем взаимодействие между спинами. Каждое ядро имеет дипольный момент., поэтому взаимодействие между ядрами можно рассматривать как дипольное взаимодействие. Каждое ядро находится не только во внешнем постоянном поле, но и в поле, созданном другим ядром $B_{\text{лок}}$. Отсюда следует, что действие внешнего магнитного поля $B_0$ для каждого ядра не будет одинаковым. Каждый атом создает вокруг себя локальное поле

$$B_{\text{лок}} = \mu_0 r^{-3} \tag{5.10}$$

Отсюда видно, что при удалении от ядра локальное поле быстро убывает.

Очевидно, что переход на более высокий уровень происходит, когда частоты прецессий магнитных моментов соседних атомов совпадают. При этом происходит обмен энергиями между соседними ядрами. Если частоты прецессий двух спинов различаются на величину $\delta\omega_0$, и они находятся в

первоначально фазе, то их фазы разойдутся через время $1/\delta\omega_0$. Используя (2.3) и (5.10) получим

$$\delta\omega_0 \sim \gamma B_0 \sim \frac{{\mu_0}^2}{\hbar r^3} \tag{5.11}$$

Подставляя в (5.11) $r = 1$Åполучим величину $\sim 10^{-4}$сек$^{-1}$. Время релаксации можно определить, как

$$T_2 \sim \frac{1}{\delta\omega_0} \sim 10^{-4}\text{сек} \tag{5.12}$$

Это время называется поперечным *временем релаксации* или временем *«фазовой памяти»*.

## Химический сдвиг

Следует заметить, что спектроскопия ядерного магнитного резонанса не используется для определения магнитно-различающихся ядер в соединении, как это может показаться на первый взгляд. На это имеется ряд причин. Во-первых, такое использование ЯМР спектроскопии является чрезвычайно трудным, так как для измерения резонансных частот приходится изменять методику и условия. Во-вторых, существую другие более точные методы (масс-спектрометрия, элементный анализ), позволяющие определить состав вещества. На самом деле значение ЯМР спектроскопии для химиков заключается в том, что данный метод позволяет различить ядра одного типа, находящиеся в разном химическом окружении.

Как оказалось, на резонансные частоты ядер влияет химическое распределение электронов в молекуле. Если рассматривать, например, протонный спектр бензилацетата, представленный на рисунке 6.1, то можно различить три различных сигнала.

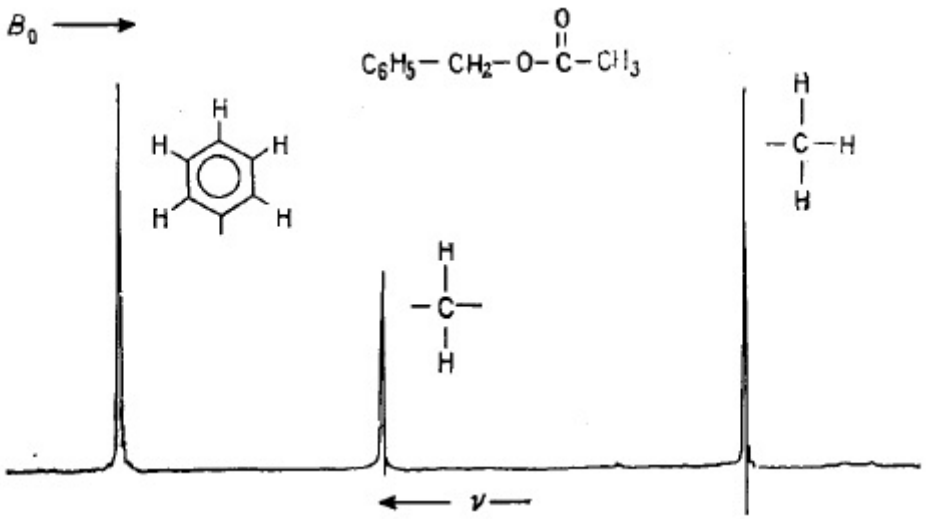



Рисунок 6.1 Протонный ЯМР спектр бензилацетата

Это сигналы от протонного фенильного ядра, метиленовой и метильной групп. Данное разделение сигналов вызвано различным химически окружением протонов и было названо *химическим сдвигом*. Внешнее магнитное поле $B_0$экранируется электронным облаком. В этом случае возникает локальное магнитное поле, которое понижает внешнее магнитное поле на величину

$$B_{\text{лок}} = (1 - \sigma)B_0 \qquad (6.1)$$

где $\sigma$ - константа экранирования, которая зависит от электронной плотности 1sорбитали.

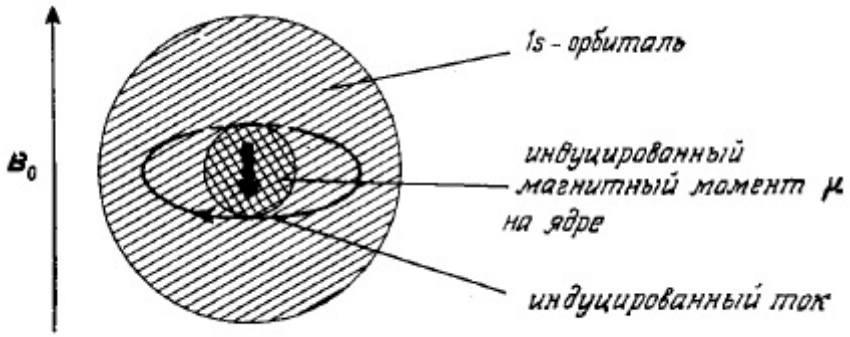



Рисунок 6.2 Экранирование протона в магнитном поле

Если сферическое электронное распределение потенциала не искажено, то $\sigma$ можно найти по формуле Лэмба:

$$\sigma = \left(\frac{\mu_0 e^2}{3m_e}\right) \int_0^\infty r\rho(r)dr \qquad (6.2)$$

где $\rho(r)$ - электронная плотность.

В молекулах сферическая симметрия электронного распределения искажается. Это явление можно рассматривать, как возникновение парамагнитного момента, услеживающего внешнее магнитное поле. Тогда $\sigma$будет вычисляться как

$$\sigma = \sigma_{\text{диа}} + \sigma_{\text{пара}} \qquad (6.3)$$

Для вычисления $\sigma$ предполагает знание о природе эектронного движения по всей молекуле. На данном этапе развития науки таких знаний для больших молекул не имеется. Поэтому при вычислении $\sigma$ для больших молекулв уравнение (6.3) включают третий член $\sigma$`, который ответственен за вклады от отдельных атомов и групп. При учете этого вклада уравнение (6.3) перепишется в виде:

$$\sigma = \sigma_{\text{диа}}^{\text{лок}} + \sigma_{\text{пара}}^{\text{лок}} + \sigma` \qquad (6.4)$$

Основной вклад для протонов дают $\sigma_{\text{диа}}^{\text{лок}}$ и $\sigma$`. При рассмотрении некоторых соединений протоны различают на экранированные и дезэкранированный относительно некоторого эталонного сигнала в спектре. Например, в спектре бензилацетата (рисунок 6.1) метильные протоны экранированы, а ароматические дезэкранированны относительно метиленовых протонов.

### δ-шкала, τ-шкала, интегрирование сигнала

В ЯМР спектрометрии существует своя система измерений химического сдвига. Для указания положения резонансного сигнала в спектре можно измерять величины $B_0$ и $\nu$. Но это не представляется удобным, так как эти величины у разных спектрометрах разные. Так же точное определение этих величин технически трудно осуществимо. Поэтому положение резонансного сигнала измеряют относительно некоторого *эталонного сигнала*. Обычно в качестве этого сигнала берут тетраметилсилан (ТМС). Его протоны дают

узкий сигнал, который записывают одновременно с сигналом исследуемого вещества. ТМС обладает всеми свойствами, которые необходимы эталонному сигналу:

1) Сигнал ТМС – интенсивный синглет

2) Так как сигнал ТМС отличается от сигналов других протонов, не наблюдается перекрывание сигналов в спектре

3) ТМС химически инертен и легко удаляется из образца после измерения

После записи нужно провести колибровку спектра. Модулируется сигнал, который отстоит от эталонного на определенную частоту (например, 500 Гц). Этот сигнал дает на спектре *боковую полосу*. Теперь расстояние между эталонным сигналом и боковой полосой можно разбить на относительные расстояния в единицах частоты, а сигналы протонов в спектре измерить с хорошей точностью.

В соответствии с уравнением (1) полученые величины все еще зависят от напряженности магнитного поля. Поэтому, для измерения химического сдвига, вводят безразмерную величину:

$$\delta = \frac{\nu_{\text{вещество}} - \nu_{\text{эталон}}}{\nu_0} \quad (3)$$

где $\nu_0$ – рабочая частота спектрометра. В качестве единиц для $\delta$ выбраны миллионные доли (м. д.).

В некоторых случаях вместо $\delta$ шкалы используют $\tau$ шкалу. Нулю в $\delta$ шкале приписано значение 10 м.д. в $\tau$ шкале. Таким образом можно выразить связь между этими двумя величинами:

$$\tau = 10{,}0 - \delta \quad (4)$$

Удобство $\tau$ шкалы заключается в том, что в ней значения $\tau$ возрастают слева направо. Однако спектроскопически правильно является $\delta$ шкала.

Из рисунка 1 можно заметить, что сигналы протонов отличаются интенсивностью. При более детальном изучении оказывается, что интенсивность показывает относительное количество протонов в веществе.

Другими словами, площадь под кривой зависит от количества протонов данного типа в веществе. В ЯМР спектрометре есть встроенный интегратор, который автоматически рисует «ступеньки», высота которых зависит от площади под кривой резонансного сигнала. Так по отношению высот ступенек можно судить об отношении числа протонов в образце. Следует отметить, что по высоте резонансного сигнала нельзя судить о числе протонов, так как ширины сигналов различаются.

## Простые правила интерпретации сверхтонкой структуры в спектрах

Простые правила интерпретации сверхтонкой структуры в спектрах будут объяснены на примере спектра этилформиата (рисунок 2). Из рисунка видно, что число сигналов в мультиплете на единицу больше числа протонов в соседней группе.

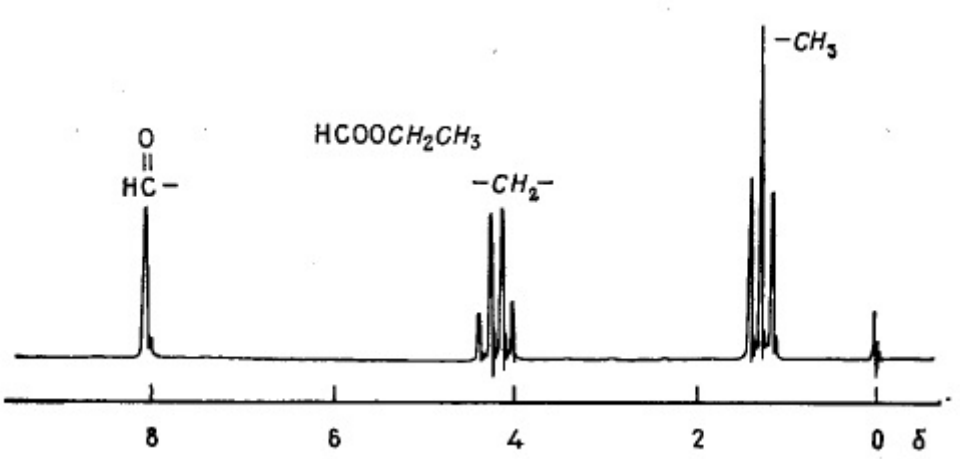



Рисунок 2 ЯМР спектр этилформиата [1]

Этот факт объясняется тем, что каждый протон в отдельно взятой группе может находиться в двух состояниях $\alpha$ и $\beta$. Если перебрать все возможные комбинации этих состояний и посчитать значение полного спина для группы, то можно заметить, что группа $CH_3$, например, будет иметь 4 сигнала. В таблице ниже приведены значения полных спинов для групп $CH_3$ и $CH_2$.

| $CH_2$-группа | Полный спин | $CH_3$-группа | Полный спин |
|---|---|---|---|
| $\alpha\alpha$ | +1 | $\alpha\alpha\alpha$ | $+\frac{3}{2}$ |
| $\alpha\beta$ $\beta\alpha$ | 0 | $\alpha\alpha\beta$ $\alpha\beta\alpha$ $\beta\alpha\alpha$ | $+\frac{1}{2}$ |
| $\beta\beta$ | -1 | $\alpha\beta\beta$ $\beta\alpha\beta$ $\beta\beta\alpha$ | $-\frac{1}{2}$ |
| | | $\beta\beta\beta$ | $-\frac{3}{2}$ |

Таблица 1 Полный спин для различных состояний протонов в группах $CH_3$ и $CH_2$.

Так же следует отметить, что интенсивности сигналов в мультиплете соответствуют вериятности реализации состояний группы. Так, например, в в группе $CH_2$ интенсивности относятся как 1:2:1.

Существуют следующие *простые правила интерпретации сверхтонкой структуры в спектрах*:

1) Ядра со спиновым числом $I=1/2$ имеют мультиплетность $n+1$, где $n$ – число ядер в соседней группе. Если имеется еще одна соседняя группа, протоны которой имеют отличный от протонов данной группы химический сдвиг, то влияние двух соседних групп следует рассматривать отдельно в произвольном порядке. Другими словами, если некоторое ядро имеет два соседних ядра, отличающихся по химическому сдвигу, то сигнал от данного ядра будет разбиваться на дублет дублетов.

2) Константа спин спинового взаимодействия между двумя рассматриваемыми ядрами есть расстояние между их мультиплетами в герцах.

3) Относительные интенсивности в сигналов в мультиплетах определяются как коэффициенты биномиального ряда. Эти коэффициенты можно определить из треугольника Паскаля (рисунок 3)

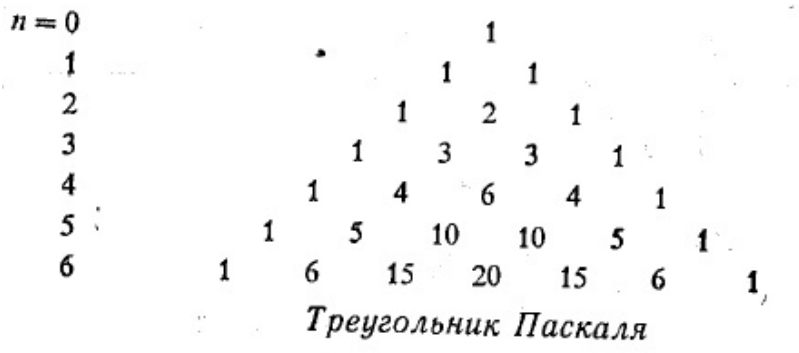



Рисунок 3 Треугольник Паская

4) Величина спин спинового взаимодействия уменьшается с увеличением связей, разделяющих данные ядра. Если количество связей становится равно пяти, то спин спиновое взаимодействие почти не наблюдается.

5) Вид спинового мультиплета не зависит от знаков констант спин спинового взаимодействия.

Как видно из названия, представленые правила являются простыми и имеют свои *пределы применимости*.

Во-первых, нужно отметить, что простые правила применимы только к магнитно эквивалентным ядрам. Следует пояснить, что *магнитно эквивалентные* ядра – это те ядра, которые имеют общую резонансную частоту и общее для всех значение константы спин спинового взаимодействия. Если ядра имеют только одну резонансную частоту, то они называются *изохронными*. Изохронные ядра часто химически эквивалентны, т.е. имеют одинаковое химическое окружение.

Во-вторых, простые правила можно использовать только если разность химических сдвигов отдельных групп магнитно эквивалентных ядер $\nu_0\delta$ велика по сравнению с константой спин спинового взаимодействия между этими группами. В этом случае мы говорим о *спектре первого порядка*. Если величина $\nu_0\delta$ того же порядка, что и константа спин спинового взаимодействия, то наблюдается *эффект крыши*. Интенсивность у линий,

ближайших к соседнему мультиплету, сильно увеличивается, и спадает по мере удаления.

### Влияние электронной плотности на протоне и соседних атомах углерода

Циркуляция электрона атома водорода порождает локальное магнитное поле, которое препятствует влиянию внешнего магнитного поля. Так же на локальное магнитное поле влияют соседние атомы. Рассмотрим это влияние подробнее. Во-первых, некоторые атомы (например, фтор) перетягивают на себя электронную плотность атома водорода в связи H-X. Это приводит к дезэкранированию протона, а, следовательно, увеличению влияния внешнего магнитного поля. Во-вторых, циркуляция электронов соседних атомов во внешнем магнитном поле создает свое магнитное поле, которое влияет на локальное магнитное поле протона. Кроме того следует учитывать влияние среды, электрическое поле и вандерваальсовые эффекты. Тогда уравнение для константы экранирования (которая используется в уравнении (2)) будет выглядеть следующим образом:

$$\Delta\sigma = \Delta\sigma_{\text{диа}}^{\text{лок}} + \Delta\sigma_{\text{магн}} + \Delta\sigma_{\text{ВВ}} + \Delta\sigma_{\text{эл.п}} + \Delta\sigma_{\text{ср}} \qquad (5)$$

Диамагнитное экранирование протона электронной плотностью 1s орбитали мало по сравнению с экранированием тяжелых ядер. Поэтому основной вклад в химический сдвиг протона дают окружающие его более тяжелые ядра. Следует отметить, что это экранирование сильно спадает с увеличением числа связей между протоном и более тяжелым ядром.

Рассмотрим двухатомную молекулу AB. Магнитный момент, индуцированный на атоме A внешним магнитным полем, будем считать точечным диполем. Вклад магнитного момента атома A в экранирование ядра B можно описать выражением

$$\Delta\sigma = \left(\frac{1}{12\pi}\right)\sum_{i=x,y,z}\chi_A^i(1 - 3cos^2\theta_i)/R^3 \qquad (6)$$

где $\theta_i$ – угол между направлением $\mu_A$ и осью связи AB. $R$ – расстояние между центром A и ядром B. Различные положения атома B относительно центра диполя атома A представлены на рисунке 4. B положения *а* и *б* индуцированное поле диполя A приводит к дезэкранированию внешнего магнитного поля. B положении *в* индуцированное поле напротив приводит к экранированию внешнего магнитного поля.

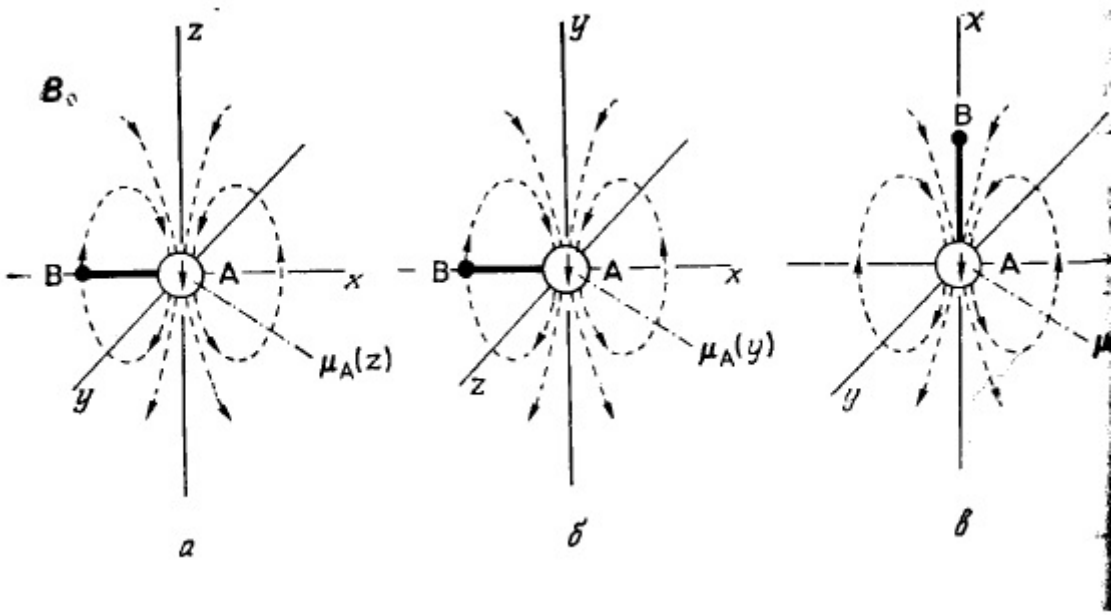



Рисунок 4 Влияние индуцированного магнитного поля диполя A на атом B в различных положениях относительно осей x,y,z

B исследуемом растворе молекулы претерпевают быстрое вращение. Так как в уравнение (6) входит множитель $(1 - 3cos^2\theta_i)$ до тех пор пока все компоненты $\chi_A(x), \chi_A(y), \chi_A(z)$ равны, изменение $\Delta\sigma$ будет равно нулю. B этом случает группа A называется *магнитно-изотропной*. B противном случае группа A называется *магнитно-анизотропной*. Если группа A магнитно-анизотропна, то магнитную анизотропию $\Delta\chi$ можно определить по формуле:

$$\Delta\chi = \chi_{\parallel} + \chi_{\perp} \quad (7)$$

Тогда магнитный вклад в химический сдвиг отдельного протона можно определить по уравнению Мак-Коннела:

$$\Delta\sigma = \Delta\chi(1 - 3cos^2\theta_i)/12\pi R^3 \quad (8)$$

Обычно результаты, полученные из уравнения (8) представляются в виде конусов (рисунок 6). Если рассматривать кратные связи, то наиболее

сильной анизотропией будут обладать двойные связи $C = C$ и $C = O$, а так же тройные связи $C \equiv C$ и $C \equiv N$. Вблизи оси тройной связи наблюдается экранирующий эффект, а в области, удаленной от нее – дезэкранирующий эффект (рисунок 6).

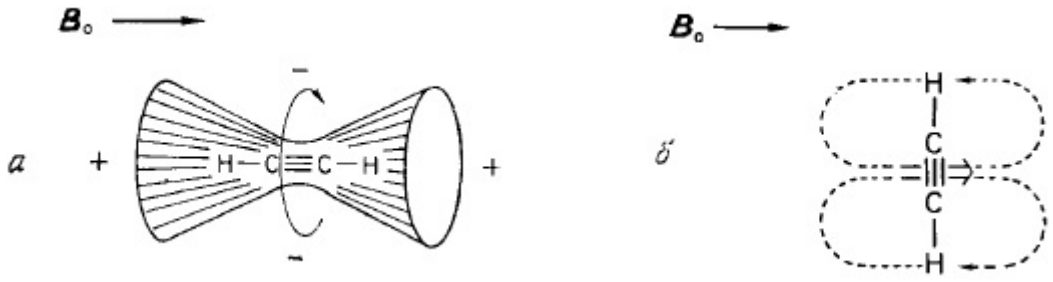



Рисунок 6 Схематическое представление эффектов магнитной анизотропии тройной связи

Двойные связи $C = C$ и $C = O$ не имеют цилиндрической симметрии, но в хорошем приближении влияние этих групп и нитрогруппы можно представить диаграммами, представленными на рисунке 7.

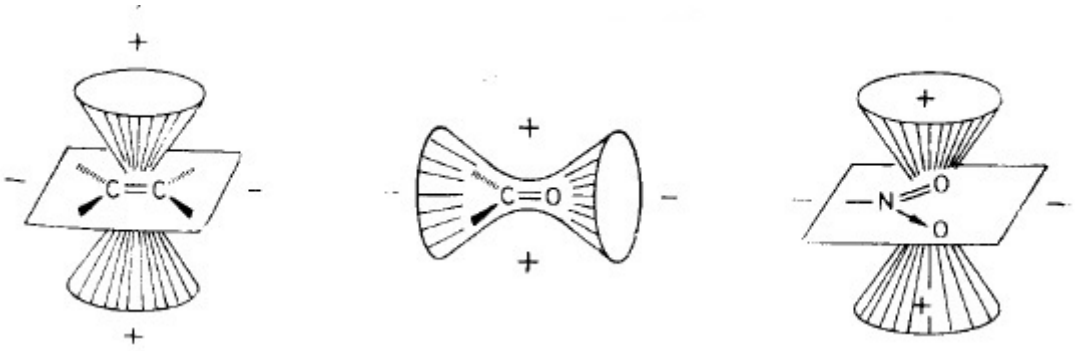



Рисунок 7 Схематическое представление эффектов магнитной анизотропии углерод-углеродной связи, карбонильной группы и нитрогруппы

Нужно подчеркнуть, что данные диаграммы пригодны только для качественной оценки. Не всегда пригодны и количественные оценки по уравнению (8), так как только осуществив грубые приближения можно говорить о модели точечных диполей.

## Эффект кольцевого тока в циклических системах

Особым случаем для протонного резонанса является молекула бензола. Схематически ее можно представить, как виток с током, в котором -электроны свободно перемещаются по кругу, образованному $\sigma$-остовом. Если поместить это соединение во внешнее магнитное поле, то возникает диамагнитный кольцевой ток. Поле, которое создает ток, можно аппроксимировать полем диполя, расположенным в центре витка и направленным против внешнего магнитного поля (рисунок 8).

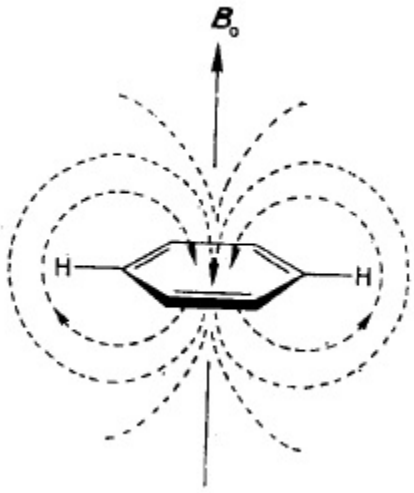



Рисунок 8 Схематическое представление анизотропии молекулы бензола

В результате протоны, расположенные в плоскости молекулы и вне кольца оказываются дезэкранированными, а протоны, которые лежат на и под плоскостью кольца – экранированными. Тогда вклад в константу экранирования можно посчитать по формуле:

$$\Delta\sigma = -(\frac{\mu_0}{4\pi})(\frac{e^2r^2}{2m_eR^3}) \quad (9)$$

где $r$ - радиус кольца, $R$- расстояние от центра витка.

При более точном анализе не применяется картина точечного диполя, и учитывается тот факт, что электронная плотность больше там, где

перекрываются $2p_z$ орбитали углерода (рисунок 9). Это приводит к появлению двух петель, одна из которых лежит над $\sigma$ скелетом, а другая под ним. Если протон поместить в центр кольца, то он окажется экранированным. Величины индуцированного магнитного поля бензольного кольца и изменения в константе экранирования $\Delta\sigma$ посчитаны и вынесены в таблицу. Такая модель кольцевого тока позволяет с хорошей точностью дать качественную оценку для *полиядерных* ароматических соединений. В *неальтернантных* углеводородах резонансные сигналы отдельных протонов можно определить при условии, если помимо эффекта кольцевого тока учитывать различие в плотностях заряда у соответствующих атомов углерода.

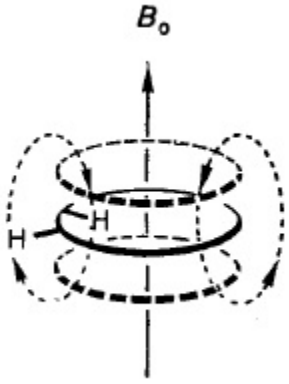



Рисунок 9 Схематическое представление анизотропии бензола при более точном рассмотрении

Рассмотрим такой класс соединений, как *аннулены*. В соответствии с *правилом Хоккеля*, аннулены с 4*n*+2 числом $\pi$ −электронов имеют ароматический характер (как, например, бензол). В этом случае происходит согласование с представленной выше теорией, т.е. протон, помещенный в центр витка, оказывается экранированным, а протон вне витка – дезэкранированным. Такие молекулы называются *диатропными*.

Если же рассматривать аннулены с 4*n* числом -электронов, то, по теории, можно обнаружить обратный эффект. Протон, помещенный в центр витка, оказывается дезэкранированным, а вне витка – экранированным. Данное

явление можно описать с помощью квантовомеханической модели. Основная идея этой модели заключается в том, что в соответствии с правилом заполнения у $4n+2$ систем внешние уровни оказываются заполненными и занятые собственные состояния дают диамагнитный вклад. У $4n$ систем каждый внешний уровень имеет по одному неспаренному электрону, что должно давать парамагнитный вклад. В действительности же никакого парамагнитного эффекта не проявляется. В соответствии с теоремой Янна и Тейлера, при расщеплении энергетических уровней два неспаренных электрона занимают низший уровень за счет альтернирования связей. Под влиянием внешнего магнитного поля происходит смешивание электронных состояний, что приводит к парамагнитному вкладу в константу экранирования, который по величине больше диамагнитного вклада низко лежащих орбиталей. В *неплоских* циклических системах с отчетливым альтернированием связей эффект кольцевого тока не проявляется, так как в них делокализация -электронов понижена, или вообще отсутствует.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Объект исследования

Объектом исследования являлся полисахаридный комплекс (ПСК), выделенный из надземной части люцерны посевной, собранной в фазу цветения в июле 2013 года в окрестностях города Ачинска, Красноярского края. После сбора надземная часть люцерны посевной была высушена на воздухе, под навесом, при температуре 15-25 °С, в течение 3-10 суток. Исследуемые образцы упаковывали и хранили в соответствии с требованиями нормативной документации (ОСТ 43-3-84, ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып. 2).

### Методы исследования

Полисахаридный комплекс получали водной экстракцией надземной части люцерны посевной с последующим осаждением полисахаридов трехкратным объемом спирта этилового. Для очистки от сопутствующих низкомолекулярных экстрактивных веществ проводили диализ, используя диализные мешки с размерами пор 3-5 кДа (“Orange Scientific”, Бельгия). После диализа раствор замораживали и лиофильно высушивали на лабораторной установке SP Scientific Advantage EL-85 (пр-во США).

Для определения величины оптического поглощения использовали спектрофотометр UNICO 2800 (пр-во США).

Для выделения индивидуальных полисахаридов применяли метод ионообменной колоночной хроматографии, используя стеклянную колонку объемом 103 см3, а в качестве сорбента DEAE-целлюлозу ($Cl^-$-форма) марки DEAE 32 Servacel (США).

Мономерный состав ПСК, а также структуру индивидуальных компонентов устанавливали с помощью физико-химических методов:

1) Моносахара в гидролизате идентифицировали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в виде

соответствующих триметилсилильных производных (ТМС) моносахаридов.

Хроматомасс-спектры регистрировали на газовом хроматографе Agilent 7890A (США) на колонке 1 MS 30 м, внутренний диаметр капилляра 0,15 мм, детектирование велось на масс-спектрометре Agilent 5975S (США).

2) Спектры ЯМР 1Н записывали на спектрометре DRX-300 («Bruker», Германия).

### Выделение полисахаридного комплекса люцерны посевной

Навеску сырья заливали раствором воды очищенной, подщелоченной раствором натрия гидроксида до значения pH=9 по индикаторной бумаге. Нагревали полученную смесь на кипящей водяной бане в течение 1 часа при периодическом перемешивании. После 24-часового отстаивания смесь снова нагревали в течение 1 часа, оставляли для охлаждения до комнатной температуры и отфильтровывали через многослойный тканевый фильтр. Фильтрат упаривали под вакуумом при температуре не более 50 °С. К полученному раствору приливали трехкратный объем 95%-ного спирта этилового и оставляли в прохладном месте для отстаивания осадка на 24 часа. Отстоявшийся раствор сливали, а осадок отфильтровывали через бумажный фильтр, промывая последовательно 95%-ным спиртом этиловым, далее ацетоном. Затем осадок, не высушивая, переносили с фильтра в стеклянный стакан и растворяли в воде очищенной при быстром перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 часов при комнатной температуре. Затем полученный раствор центрифугировали (4000 об / мин – 30 мин) и упаривали. Полученный раствор диализировали с целью удаления низкомолекулярных примесей в течение 48 часов против воды водопроводной при комнатной температуре, меняя воду через 24 часа на воду очищенную. После диализа раствор замораживали и лиофильно высушивали на лабораторной установке Free Zone («Labconco», США). Схема выделения полисахаридного комплекса из надземной части люцерны посевной изображена на рисунке 6.

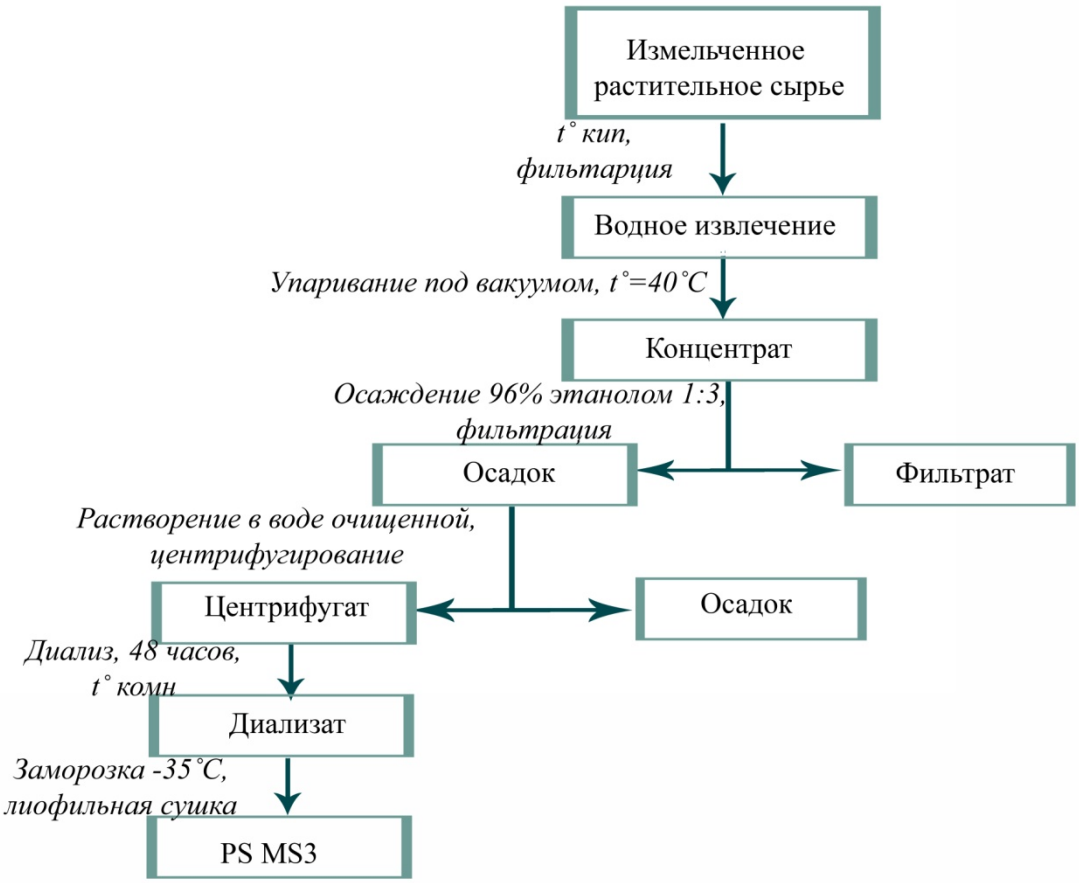



Рисунок 4 – Схема выделения ПСК из надземной части люцерны посевной

Полученное вещество представляло собой желтовато-бурый аморфный порошок без запаха, растворим в воде (опалесцирующий раствор), осаждается спиртом, ацетоном.

### Разделение полисахаридного комплекса люцерны посевной методом ионообменной хроматографии

Для разделения полисахаридного комплекса на индивидуальные полисахариды был использован метод ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (в Cl-форме). В качестве подвижной фазы использовались растворы NaCl (0,01-1,0 моль/л). Навеску ПСК 100 мг растворяли в течении 1,5 часов в 2 мл воды очищенной при постоянном перемешивании. Раствор ПС пропускали через колонку объемом 81 $см^3$. Элюат собирали по 40 мл; наличие ПС контролировали карбазол-серным методом (в пробирки отбирали по 0,1 мл из каждой пробирки. По стенке пробирки, по каплям добавляли по 0,75 мл

раствора натрия тетрабората в кислоте серной, тщательно встряхивали. Затем пробирки вместе со штативом помещали в кипящую водяную баню на 6 мин, после чего их переносили для охлаждения в сосуд со льдом. Далее в пробирки добавляли по 0,02 мл 0,2 % раствора карбазола и вновь помещали в кипящую водяную баню на 10 мин, затем охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптические плотности растворов при длине волны 525 нм. Раствором сравнения служила смесь кислоты серной с натрия тетраборатом (0,75 мл), карбазола (0,02 мл) и воды очищенной (0,1 мл)). Каждую фракцию концентрировали на мембранном фильтре (Vivaspin) с размером пор 3-100 кДа. Полученные гелеобразные концентраты переносили в пластиковые виалы, замораживали при -28°С и лиофильно высушивали. Высушенные фракции взвешивали.

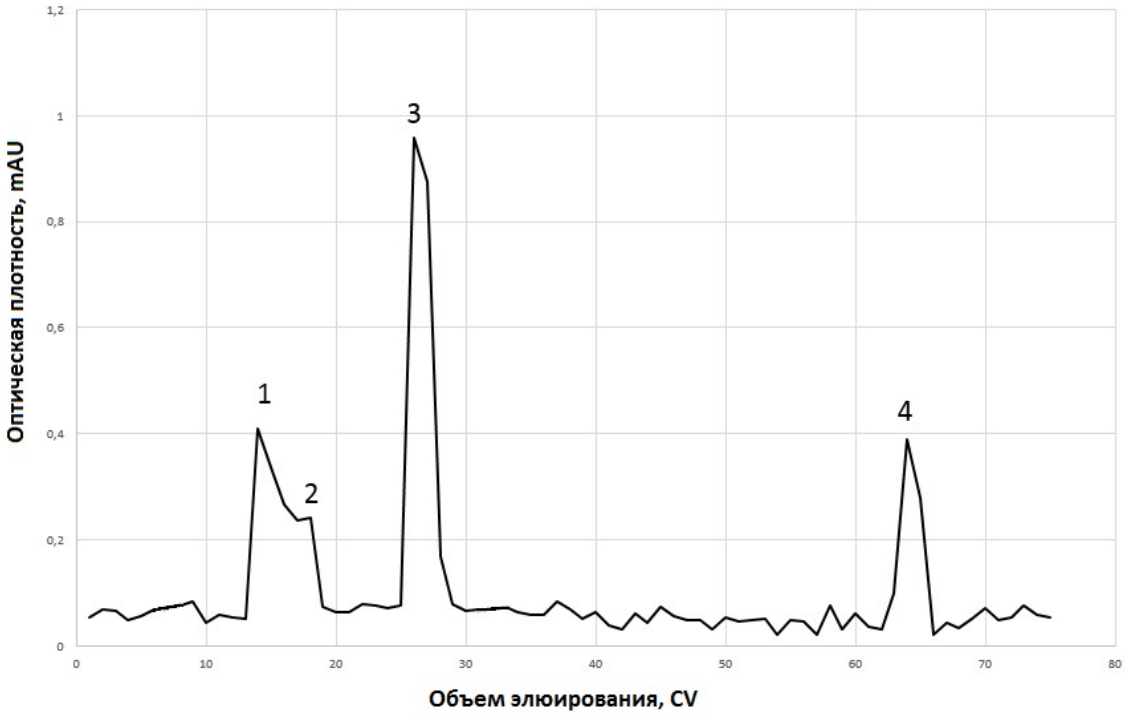



Рисунок 6 – Хроматограмма фракционирования ПСК люцерны посевной на ДЭАЭ-целлюлозе

В результате разделения ПСК было получено 4 основных компонента (рис 6). Для дальнейшего исследования был выбран индивидуальный полисахарид №3.

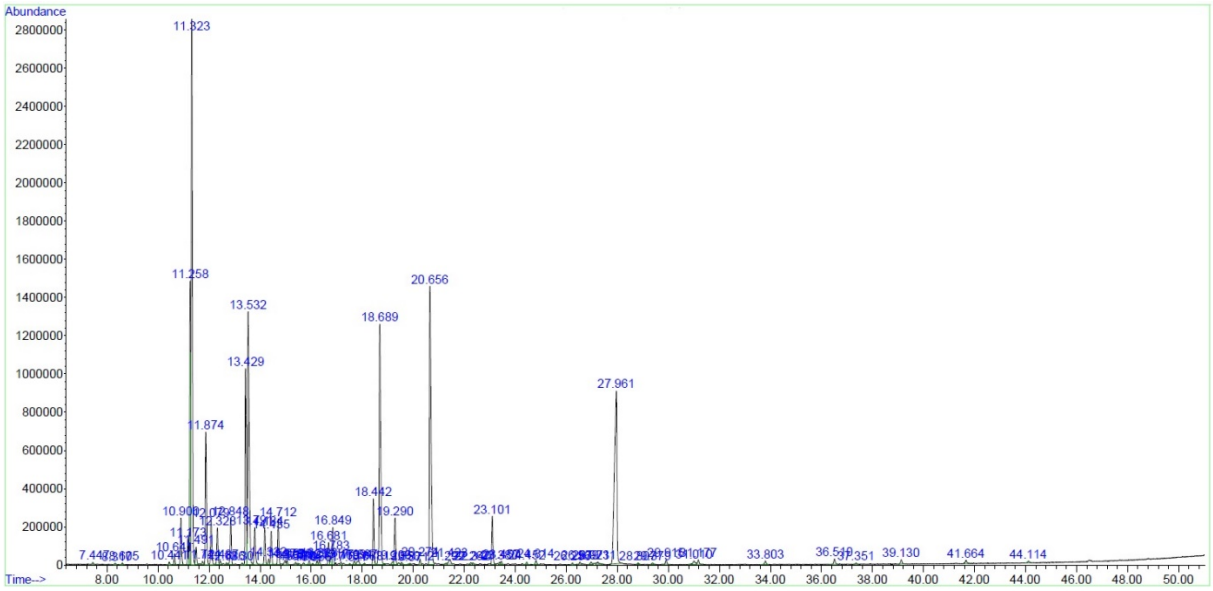



Рисунок 7 – ГЖ-хроматограмма индивидуального ПС

По данным ГЖХ-МС (рис.16) установлено, что в индивидуальном ПС присутствуют ксилоза, глюкоза, арабиноза и галактуроновая кислота.

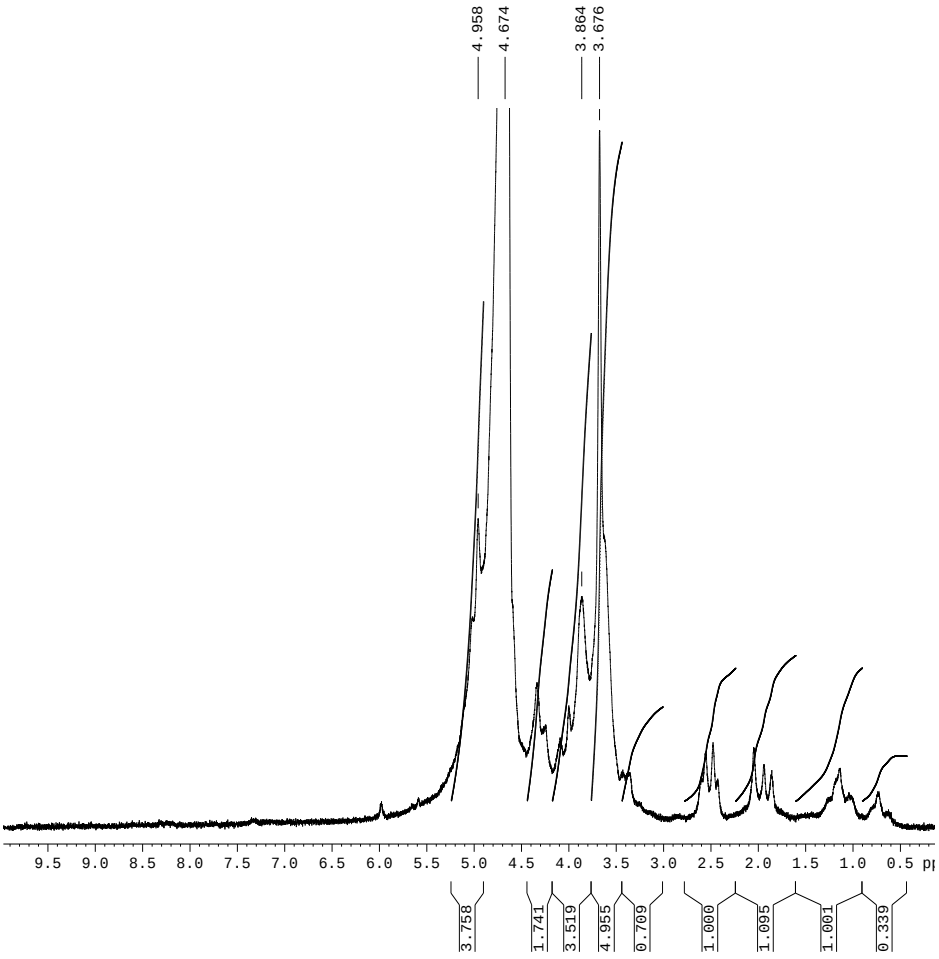



Рисунок 17 – ПМР-спектр индивидуального ПС

ПМР спектр имеет сложный вид, что свидетельствует о полимерном составе исследуемого образца. Сигналы в области 3.864, 4.958 и 4.25 м.д. $^{1}$Н-ЯМР спектра (рис. 17) свидетельствуют о наличии в молекуле остатков галактуроновой кислоты. Сигнал в области 4.35 м.д. относится к сигналу протонов остатков арабинозы в фуранозной форме. Сигналы в области 2.0-2.5 м.д. в $^{1}$Н-ЯМР-спектре соответствуют сигналам, которые дает ацетилированная форма остатков сахаров. Сигнал в области 3.676 м.д. относится к сигналу ксилозы.

Данные ЯМР анализа согласуются с результатами анализа мономерного состава полисахарида, полученного с помощью ГЖХ-МС.

# ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

Введение

Целью настоящей работы является исследование зависимости антиоксидантной активности и количества флавоноидов от состава экстрагента.

Флавоноиды можно считать источниками средств общего действия из-за большого диапазона их биологической активности флавоноидов. Флавоноиды не накапливаются в организме, быстро выводятся и проявляют мягкое воздействие на организм. Препараты из флавоноидов применят как для лечения заболеваний так и для профилактики различных нарушений. Около 150 флавоноидов обладают Р-витаминной активностью, относщиесся к группам халконов, флавонов, флаванонов, катехинов.

Многие ученые объясняют широкий спектр биологической активности флавоноидов их антиоксидантными свойствами, так как звеном большинства патологий является перекисное окисление липидов [14].

## 4.1. Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

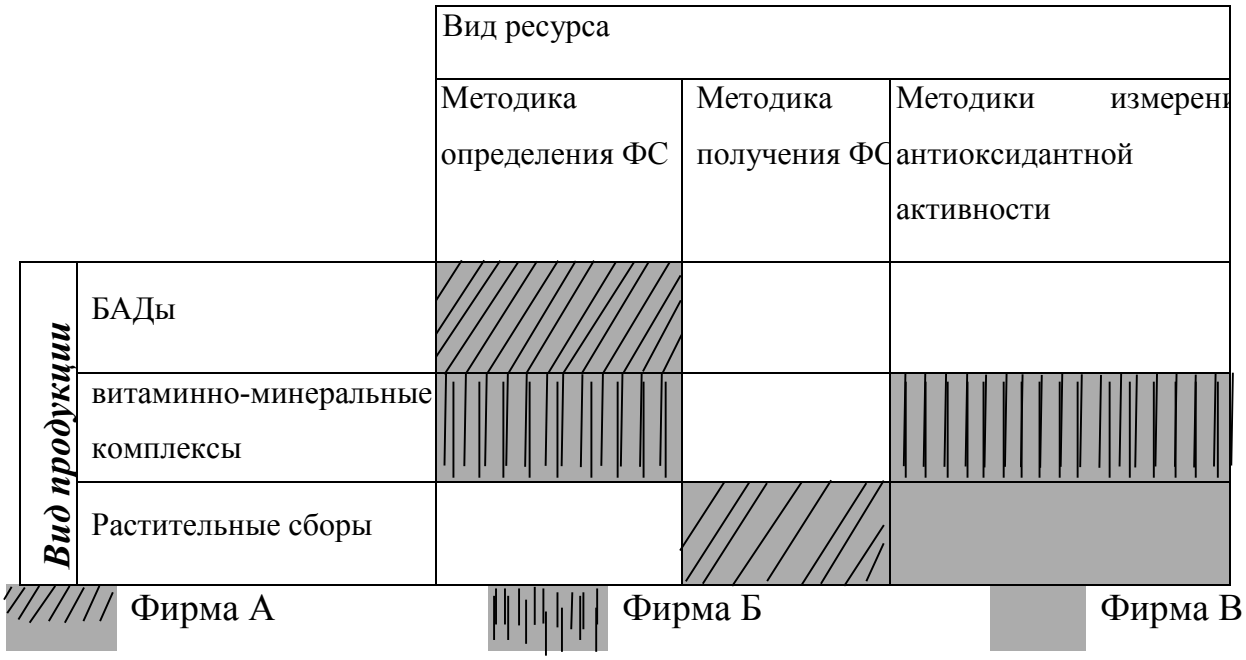
### 4.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования

Сегментирование – это разделение покупателей на однородные группы, для каждой из которых может потребоваться определенный товар (услуга).

Основные предполагаемые потенциальные конкуренты, производящие препараты на основе люцерны посевной  это  ОАО «NSP» и ООО «НПП «Эраконд-Урал». Также фирмой специализирующейся на производстве лекарственных препаратов на основе растительного сырья является ЗАО «Эвалар»

На основании этих данных строится карта сегментирования рынка. (Рисунок 4.1)

Рисунок. 4.1 – Карта сегментирования рынка услуг




4.1.2. Анализ конкурентных технических решений

Проведем анализ двух конкурирующих препаратов на основе люцерны посевной: «Alfalfa» и «Эрамин» (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений.

| **Критерии оценки** | **Вес крите-рия** | **Баллы** | | | **Конкуренто-способность** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $Б_ф$ | $Б_{к1}$ | $Б_{к2}$ | $К_ф$ | $К_{к1}$ | $К_{к2}$ |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| **Технические критерии оценки ресурсоэффективности** | | | | | | | |
| 1.Изученность фармакокинетики | 0,7 | 5 | 5 | 2 | 3,5 | 3,5 | 1,4 |
| 2. Определенный состав | 0,05 | 5 | 5 | 3 | 0,25 | 0,25 | 0,15 |
| 3. Внешний вид и цвет | 0,03 | 5 | 4 | 4 | 0,15 | 0,12 | 0,12 |
| 4. Устойчивость к свету | 0,02 | 2 | 2 | 5 | 0,04 | 0,04 | 0,1 |
| 5. Запах | 0,02 | 5 | 5 | 2 | 0,1 | 0,1 | 0,04 |
| **Экономические критерии оценки эффективности** | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Конкурентоспособность продукта | 0,01 | 5 | 5 | 2 | 0,05 | 0,05 | 0,02 |
| 2. Уровень проникновения на рынок | 0,01 | 5 | 5 | 5 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| 3. Цена | 0,06 | 3 | 3 | 5 | 0,18 | 0,18 | 0,3 |
| 4. Предполагаемый срок эксплуатации | 0,01 | 5 | 5 | 3 | 0,05 | 0,05 | 0,03 |
| 5.Послепродажное обслуживание | 0,01 | 3 | 3 | 3 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| 6. Финансирование научной разработки | 0,01 | 4 | 4 | 4 | 0,04 | 0,04 | 0,04 |
| 7. Срок выхода на рынок | 0,02 | 5 | 5 | 5 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 8. Наличие сертификации разработки | 0,05 | 5 | 5 | 5 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| **Итого** | **1** | | | | 4,79 | 4,76 | 2,38 |

где Бф – проектируемаяметодика,

БК1 – газовая хроматография.

БК2 – тонкослойная хроматография.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$К = \sum В_i \cdot Б_i , \qquad (1)$$

гдеК – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

Bi – вес показателя (в долях единицы);

Бi – балл i-го показателя.

Разработка и производства проводится в соответствии стандартов GLP и GMP, значит конкурентоспособность продукта можно оценить по коммерческим критериям эффективности. Суммарный балл конкурентоспособности для проектируемой методики максимален. Уязвимость нашей методики заключается в том, что для послепродажного обслуживания необходимо привлекать

дополнительные финансы, однако более высокая изученность фармакокинетики позволяет нашей методике успешно конкурировать.

### 4.1.3. SWOT-анализ

SWOT – сильные стороны(strengths), слабые стороны (weaknesses), возможности (opportunities) и угрозы (threats) – представляет собой комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Он проводится в несколько этапов. (таблица 4.2 и 4.3)

Таблица 4.2 – Матрица SWOT.

| | **Сильные стороны научно-исследовательского проекта:**<br>С1.Заявленная экономичность технологии.<br>С2. Экологичность технологии.<br>С3. Более низкая стоимость исследований по сравнению с другими.<br>С4. Наличие бюджетного финансирования.<br>С5. Квалифицированный персонал. | **Слабые стороны научно-исследовательского проекта:**<br>Сл1. Отсутствие у потенциальных потребителей квалифицированных кадров по работе с научной разработкой<br>Сл2. Большой срок поставок материалов и комплектующий, используемые при проведении научного исследования<br>Сл3. Высокая продолжительность подготовительных стадий<br>Сл4. Низкий уровень проникновения на рынок |
|---|---|---|
| **Возможности:**<br>В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ<br>В2. Снижение таможенных пошлин на сырье и материалы, используемые при научных исследований<br>В3. Повышение стоимости конкурентных разработок | Инфраструктура ТПУ позволяет снизить стоимость исследования по сравнению с другими и облегчает получение бюджетного финансирования.<br>Снижение таможенных пошлин и повышение стоимости конкурентных разработок влияет на все | Инфраструктура ТПУ позволяет снизить срок поставок, продолжительность стадий и повысить уровень проникновения на рынок. Снижение таможенных пошлин позволяет снизить срок поставок материалов. |

| | | |
|---|---|---|
| | сильные стороны кроме экологичности технологии | |
| **Угрозы:**<br>У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства<br>У2. Развитая конкуренция технологий производства<br>У3. Ограничения на экспорт технологии<br>У4.Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции<br>У5.Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства | Отсутствие спроса может привести к утечке квалифицированных кадров и прекращению бюджетного финансирования. Развитая конкуренция может не дать продукту удержаться на рынке. Ограничение на экспорт может способствовать уменьшению бюджетному финансированию. Введение дополнительных требований к сертификации продукта и несвоевременное финансовое обеспечение влияет на экономичность и цену продукта. | Отсутствие спроса, развитая конкуренция и ограниченя на экспорт приведут к низкому уровню проникновения на рынок. Введение дополнительных требований к сертификации приводит в сочетании с отсутствием квалифицированных кадров значительно усложняет вывод продукции на рынок. |

Таблица 4.3 – Интерактивная матрица проекта.

| Сильные стороны проекта | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Возможности проекта | | С1 | С2 | С3 | С4 | С5 |
| | В1 | 0 | - | + | + | - |
| | В2 | + | - | + | + | + |
| | В3 | + | - | + | + | + |
| Сильные стороны проекта | | | | | | |
| Угрозы проекта | | С1 | С2 | С3 | С4 | С5 |
| | У1 | - | - | - | + | + |
| | У2 | + | 0 | + | + | + |
| | У3 | - | - | - | + | - |
| | У4 | + | - | + | + | + |
| | У5 | + | - | + | + | + |
| Слабые стороны проекта | | | | | | |
| Возможности проекта | | Сл1 | Сл2 | Сл3 | Сл4 | |
| | В1 | - | + | + | + | |
| | В2 | - | + | - | - | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | В3 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Слабые стороны проекта | | | | | | |
| Угрозы проекта | | Сл1 | Сл2 | Сл3 | Сл4 | |
| | У1 | - | - | - | + | |
| | У2 | - | - | - | + | |
| | У3 | - | - | - | + | |
| | У4 | + | 0 | 0 | + | |
| | У5 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

## 4.2. Планирование научно-исследовательских работ

### 4.2.1. Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научных исследований формируется рабочая группа, в состав которой могут входить научные сотрудники и преподаватели, инженеры, техники и лаборанты, численность групп может варьироваться. По каждому виду запланированных работ устанавливается соответствующая должность исполнителей.

Таблица 4.4 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

| Основные этапы | № раб | Содержание работ | Должность исполнителя |
|---|---|---|---|
| Разработка технического задания | 1 | Составление и утверждение технического задания | Руководитель темы |
| Выбор направления исследований | 2 | Подбор и изучение материалов по теме | Дипломник |
| | 3 | Выбор направления исследований | Руководитель, Дипломник |
| | 4 | Календарное планирование работ по теме | Руководитель, Дипломник |
| Теоретические и экспериментальные исследования | 5 | Проведение теоретических расчетов и обоснований | Дипломник |
| | 6 | Построение макетов (моделей) и проведение экспериментов | Дипломник |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 7 | Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями | Руководитель, Дипломник |
| Обобщение и оценка результатов | 8 | Оценка эффективности полученных результатов | Руководитель, Дипломник |
| | 9 | Определение целесообразности проведения ОКР | Руководитель, Дипломник |
| *Проведение ОКР* | | | |
| Оформление отчета по НИР (комплекта документации по ОКР) | 10 | Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документации) | Дипломник |

4.2.2. Определение трудоемкости выполнения работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества трудно учитываемых факторов. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости используется следующая формула:

$$t_{\text{ожі}} = \frac{3t_{\min i} + 2t_{\max i}}{5}, (2)$$

где – ожидаемая трудоемкость выполнения і-ой работы чел.-дн.;

– минимально возможная трудоемкость выполнения заданной і-ой работы (оптимистическая оценка: в предположении наиболее благоприятного стечения обстоятельств), чел.-дн.;

– максимально возможная трудоемкость выполнения заданной і-ой работы (пессимистическая оценка: в предположении наиболее неблагоприятного стечения обстоятельств), чел.-дн.

Определение продолжительности работ в рабочих днях производится по формуле:

$$T_{\text{р}_i} = \frac{t_{\text{ожі}}}{\text{Ч}_i}, \qquad (3)$$

где – продолжительность одной работы, раб.дн.;

– ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел.-дн.

– численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

### 4.2.3. Разработка графика проведения научного исследования

Формула для перевода рабочих дней в календарные:

$$T_{\text{к}i} = T_{\text{р}i} \cdot k_{\text{кал}}, \qquad (4)$$

где $T_{\text{к}i}$– продолжительность выполнения *i*-й работы в календарных днях;

$T_{\text{р}i}$ – продолжительность выполнения *i*-й работы в рабочих днях;

$k_{\text{кал}}$ $\text{k}_{\text{кал}}$– коэффициент календарности.

*Формула для расчета коэффициента календарности:*

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \qquad (5)$$

где $T_{\text{кал}}$ – количество календарных дней в году;

$T_{\text{вых}}$ – количество выходных дней в году;

$T_{\text{пр}}$ – количество праздничных дней в году.

*Расчет коэффициента календарности:*

$$k_{\text{кал}} = \frac{365}{365 - 104 - 14} = 1{,}478$$

Таблица 4.5–Временные показатели проведения научного исследования

| **Название Работы (Этапы)** | **Трудоёмкость работ** | | | **Исполнители** | **Длительность работ в рабочих днях** $T_{\text{р}i}$ | **Длительность работ в календарных днях** $T_{\text{к}i}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $t_{min}$, чел-дни | $t_{max}$, чел-дни | $t_{ожі}$, чел-дн | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Разработка технич. Задания | 1 | 3 | 1,8 | Руков. | 1,8 | 3 |
| Подбор и изучение материалов по теме | 17 | 21 | 18,6 | Дипл. | 18,6 | 28 |
| Выбор напр. Исслед. | 4 | 6 | 4,8 | Руков., дипл. | 2,4 | 4 |
| Календарное планирование работ | 2 | 4 | 2,4 | Руков., дипл. | 1,2 | 2 |
| Проведение теоретических расчетов и обоснований | 7 | 10 | 8,2 | Дипл. | 8,2 | 13 |
| Построение моделей и проведение экспериментов | 27 | 30 | 28,2 | Дипл. | 28,2 | 42 |
| Сопоставл. Результ. Эксперим. Стеоретич. Исслед. | 4 | 6 | 4,8 | Руков., дипл. | 2,4 | 4 |
| Оценка эффективности полученных результатов | 2 | 4 | 2,4 | Руков., дипл. | 1,2 | 2 |
| Опред. Целесообр. Проведения ОКР | 2 | 4 | 2,4 | Руков., дипл. | 1,2 | 2 |
| Оформление отчета по НИР | 7 | 9 | 7,8 | Дипл. | 7,8 | 12 |

Таблица 4.6 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме

| № работ | Вид работ | Исполнители | $T_{кi}$, кал.дн | Продолжительность выполнения работ | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | февр. | | Март | | | апрель | | | Май | | | июнь | |
| | | | | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| 1 | Составление ТЗ | Руководитель | 3 | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Изучение литературы | Дипломник | 28 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Выбор напр. Исслед. | Руководитель, Дипломник | 4 | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | Календарн. Планир. | Руководитель, Дипломник | 2 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Теор. Расч. Иобоснов. | Дипломник | 13 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Постр. Моделей, провед. Эксперим. | Дипломник | 42 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | Сопост. Результ. Исслед. Стеор. | Руководитель, Дипломник | 4 | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | Оценка эффективн. | Руководитель, Дипломник | 2 | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Опред. Целесообр. ОКР | Руководитель, Дипломник | 2 | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | Оформление отчета по НИР | Дипломник | 12 | | | | | | | | | | | | | |

- Руководитель - Дипломник

4.3. Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

4.3.1. Расчет материальных затрат НТИ

Расчет материальных затрат осуществляется по следующей формуле:

$$З_м = (1 + k_T) \cdot \sum_{i=1}^{m} Ц_i \cdot N_{расxi} \ , \qquad (6)$$

где m – количество видов материальных ресурсов, потребляемых при выполнении научного исследования;

Npacxi – количество материальных ресурсов i-го вида, планируемых к использованию при выполнении научного исследования (шт., кг, м, м2 и т.д.);

Цi – цена приобретения единицы i-го вида потребляемых материальных ресурсов (руб./шт., руб./кг, руб./м, руб./м2 и т.д.);

kТ– коэффициент, учитывающий транспортно-заготовительные расходы (15%)

Таблица 4.7 – Материальные затраты

| Наименование | Единица измерения | Количеств | Цена за ед. руб. | Затраты н материалы, (**$З_м$**), руб. |
|---|---|---|---|---|
| Ацетонитрил | литр (л) | 15 | 1000 | 15000 |
| Спирт этиловый (96%) | литр (л) | 1 | 140 | 140 |
| Изопропиловый спирт | литр (л) | 0,07 | 222 | 15,54 |
| Ортофосфорная кислота | грамм (г) | 40 | 0,074 | 3 |
| Хлорид натрия | грамм (г) | 0,1 | 0,1 | 0,01 |
| Рутин | грамм (г) | 0,1 | 3000 | 300 |
| Галловая кислота | грамм (г) | 0,1 | 3000 | 300 |
| Кверцитин | грамм (г) | 0,1 | 3000 | 300 |
| Апигенин | грамм (г) | 0,1 | 3000 | 300 |
| Гексан | литр (л) | 0,2 | 284 | 56,8 |
| Стандарт-титр | литр (л) | 0,01 | 200 | 200 |
| | | | | |
| Итого | | | | **16615,35** |

4.3.2. Расчет затрат на специальное оборудование для научных(экспериментальных) работ

Учтем стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного НТИ и имеющегося в данной научно-технической организации, в виде амортизационных отчислений. Расчет проводим по методу равномерного прямолинейного списания – стоимость списывается равномерными долями в течение периода эксплуатации.

$$AO_i = \frac{C_{\text{пер}}}{t}\ , \qquad (7)$$

где АО – годовые амортизационные отчисления, руб;

t – срок службы оборудования, год.

Спер – первоначальная стоимость оборудования, руб;

Таблица 4.8 – Расчет бюджета затрат на приобретение спецоборудования для научных работ

| № п/п | Наименование оборудования | Кол-во едини оборудования | Цена единиц оборудовани , руб. | Общая стоимость оборудования, руб. | Срок служб оборудовани , лет | Амортизацио ные отчисления период выполнения работы, руб. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ХроматографDIONEXUltiMate 3000 | 1 | 1900000 | 1900000 | 10 | 77900 |
| 2. | pH-метр METTLER TOLED FE-20 ATC KIT | 1 | 50000 | 50000 | 10 | 2050 |
| 3 | Центрифуга eppendorfcentrifuge 5702 | 1 | 45000 | 45000 | 10 | 1845 |
| 4 | ЦентрифугаELMI CM-50 | 1 | 20000 | 20000 | 10 | 820 |
| 5 | Весы электронные GR-120 | 1 | 100000 | 100000 | 10 | 4100 |
| 6 | УФ-спектрометр UNICO | 1 | 220000 | 220000 | 10 | 9020 |
| 7 | МониторSync Master E1920 | 1 | 5000 | 5000 | 10 | 205 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | ПроцессорОРТ IPLEX 390 | 1 | 10000 | 10000 | 10 | 410 |
| 9 | ХолодильникHaier HYC-940 | 1 | 50000 | 50000 | 10 | 2050 |
| Итого | | | 2400000 | 2400000 | - | 98400 |

3.4.3. Основная заработная плата исполнителей темы

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НТИ, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату:

$$З_{зп} = З_{осн} + З_{доп}, \quad (8)$$

где Зосн – основная заработная плата;

Здоп – дополнительная заработная плата (12-20 % от Зосн).

Основная заработная плата рассчитывается по следующей формуле:

$$З_{осн} = З_{дн} \cdot T_{р}, \quad (9)$$

где Зосн – основная заработная плата одного работника;

Тр– продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. Дн. (табл. 8);

Здн– среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$З_{дн} = \frac{З_{м} \cdot М}{F_{д}}, \quad (10)$$

где Зм – месячный должностной оклад работника, руб.;

М – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

Fд – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб.дн. (таблица4.9).

Таблица 4.9 – Баланс рабочего времени

| **Показатели рабочего времени** | **Руководитель** | **Дипломник** |
|---|---|---|
| Календарное число дней | 126 | 126 |

| | | |
|---|---|---|
| Количество нерабочих дней<br>- выходные дни<br>- праздничные дни | <br>38<br>4 | <br>38<br>4 |
| Потери рабочего времени<br>- отпуск<br>- невыходы по болезни | <br>0<br>0 | <br>0<br>0 |
| Действительный годовой фонд рабочего времени | 84 | 84 |

Месячный должностной оклад работника:

$$З_м = З_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_д) \cdot k_р, \qquad (11)$$

где Зтс – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

kпр – премиальный коэффициент;

kд – коэффициент доплат и надбавок;

kр – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Таблица 4.10 –Расчёт основной заработной платы

| Исполнители | $З_{тс}$, руб. | $K_{пр}$ | $k_д$ | $k_р$ | $З_м$, Руб | $З_{дн}$, руб. | $Т_р$, раб.дн. | $З_{осн}$, руб. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Руководитель | 2124,23 | 0,3 | 0,3 | 1,3 | 4420,47 | 210,5 | 84 | 17682 |
| Дипломник | 1314,35 | 0 | 0,5 | 1,3 | 2562,98 | 122,05 | 84 | 10251,92 |
| Итого $З_{осн}$ | | | | | | | | 27933,92 |

4.3.4. Дополнительная заработная плата исполнителей темы

Расчет дополнительной заработной платы ведется по следующей формуле:

$$З_{доп} = k_{доп} \cdot З_{осн}, \qquad (12)$$

где kдоп – коэффициент дополнительной заработной платы (примем равным 0,12).

$$З_{доп(рук)} = 0{,}12 \cdot 27933{,}92 = 3352{,}07 \text{ руб.}$$

4.3.5. Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из следующей формулы:

$$З_{внеб} = k_{внеб} \cdot (З_{осн} + З_{доп}), \qquad (13)$$

где $k_{внеб}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.). Принимаем равным 0,271.

На 2015 г. в соответствии с Федерального закона от 24.07.2009 №212-ФЗ установлен размер страховых взносов равный 30%. На основании пункта 1 ст.58 закона №212-ФЗ для учреждений осуществляющих образовательную и научную деятельность в 2014 году водится пониженная ставка – 27,1%[1].

Таблица 4.11 – Отчисления во внебюджетные фонды

| **Исполнитель** | **Основная заработна плата, руб.** | **Дополнительная заработная плата, руб.** |
|---|---|---|
| Руководитель проекта | 17682 | 2121,84 |
| Студент-дипломник | 10251,92 | 1230,23 |
| Коэффициент отчислений внебюджетные фонды | 0,271 | |
| **Итого: 8478,50** | | |

4.3.6. Накладные расходы

Величина накладных расходов определяется по следующей формуле:

$$З_{накл} = (\text{сумма статей } 1 \div 5) \cdot k_{нр}, \qquad (14)$$

$$З_{накл} = 154779{,}84 \cdot 0{,}16 = 24764{,}77,$$

где $k_{нр}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов можно взять в размере 16%.

4.3.7. Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта

Таблица 4.12 – Расчет бюджета затрат НТИ

| Наименование статьи | Сумма, руб. | Примечание |
|---|---|---|

[1]Федеральный закон от 24.07.2009 №212-ФЗ «О страховых взносах в Пенсионный фонд Российской Федерации, Фонд социального страхования Российской Федерации, Федеральный фонд обязательного медицинского страхования»

| | | |
|---|---|---|
| 1. Материальные затраты НТИ | 16615,35 | Пункт 3.4.1 |
| 2. Затраты на специальное оборудовани для научных (экспериментальных) рабо | 98400 | Пункт 3.4.2 |
| 3. Затраты по основной заработной пла исполнителей темы | 27933,92 | Пункт 3.4.3 |
| 4. Затраты по дополнительно заработной плате исполнителей темы | 3352,07 | Пункт 3.4.4 |
| 5. Отчисления во внебюджетные фонды | 8478,50 | Пункт 3.4.5 |
| 6. Накладные расходы | 24764,77 | 16 % от суммы ст. 1- |
| 7. Бюджет затрат НТИ | 179544,61 | Сумма ст. 1- 6 |

## Заключение

Настоящая работа была посвящена характеристике структуры индивидуального полисахарида люцерны посевной. Данное растение давно входи в состав многих БАД, однако биологически активные соединения данного растения, такие как полисахариды, в настоящий момент мало изучены.

Во время проведения исследования был выделен полисахаридный комплекс люцерны посевной из ее надземной части, было проведено разделение полисахаридного комплекса на индивидуальные полисахариды и определен мономерный состав выбранного индивидуального полисахарида методом ГХ-МС. Данный мономерный состав был подтвержден на ПМР спектре.