



УДК 543

## Изучение хроматографического поведения некоторых азолов в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии

Комиссарова Н.В., Буланова А.В., Пурыгин П.П., Соколов А.В.

*Самарский государственный университет, Самара*

---

### Аннотация

Изучено хроматографическое поведение впервые синтезированных азотсодержащих гетероциклических соединений (азолов) с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для исследуемых азолов проверена модель Снайдера-Сочевинского и ее применимость для данного класса соединений

**Ключевые слова:** азолы, ВЭЖХ, сорбция, модель Снайдера-Сочевинского.

In the present paper chromatographic behavior for the first time synthesized nitrogen-containing heterocycles (azoles) with help reversed-phase HPLC was investigated. The model of Snyder-Sochevinskyi was obtained for investigated azoles. This model can be used for substances of azoles class.

**Key words:** azoles, HPLC, sorbtion, the model of Snyder-Sochevinsky)

---

### Введение

Одной из важнейших задач теоретических исследований в хроматографии является разработка наиболее подходящих моделей удерживания веществ, применимых к различным классам соединений. В настоящее время существует несколько моделей: модель Снайдера-Сочевинского, модель Скотта-Кучеры, модель Эльтекова, модель Ланина-Никитина [1-3]. Эти модели основаны на вытеснительном механизме, когда сорбция одних соединений происходит за счет вытеснения с поверхности сорбента молекул других соединений. Модели Ланина-Никитина и Скотта-Кучеры учитывают взаимодействие молекул сорбатов с подвижной фазой, а также межмолекулярные взаимодействия в подвижной фазе [4].

В настоящей работе исследовано хроматографическое поведение некоторых впервые синтезированных азолов в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ. Построена модель Снайдера-Сочевинского, на основе которой изучены особенности сорбции азолов.

## Теоретическая часть

В модели Снайдера [1] считается, что однородная поверхность адсорбента полностью покрыта либо молекулами подвижной фазы X, либо молекулами анализируемого вещества S. Адсорбция в этом случае описывается квазихимическим уравнением:



где  $n = \frac{A_S}{A_X}$  – отношение площадей молекул адсорбата S и растворителя X в адсорбционном слое; индексы m и a относятся к подвижным и адсорбированной фазам, соответственно. При адсорбции одной молекулы S в подвижную фазу вытесняется n молекул растворителя X.

По Снайдеру, зависимость фактора удерживания от состава бинарной подвижной фазы выражается уравнением:

$$\lg k = a - n' \cdot \lg X_m, \quad (2)$$

где  $n' = \frac{A_S}{A_M}$  – отношение площадей молекул адсорбата S и более сильно адсорбирующегося компонента подвижной фазы (модификатора M).

В модели Сочевинского [2] поверхность адсорбента не однородна, а состоит из дискретных активных центров, между которыми расположены менее активные участки. Адсорбция происходит на активных центрах. Влияние состава бинарной подвижной фазы на удерживание описывается тем же уравнением, что и в теории Снайдера:

$$\lg k = a - n'' \cdot \lg X_m. \quad (3)$$

Однако в модели Снайdera  $n'$  – отношение площадей молекул адсорбата и сильно адсорбирующегося компонента подвижной фазы, а в модели Сочевинского  $n''$  – число активных центров адсорбента, участвующих в адсорбции одной молекулы сорбата. В обоих моделях не учитывается взаимодействие между молекулами элюента и молекулами сорбатов.

Так как и в модели Снайдера, и в модели Сочевинского предполагается, что поверхность адсорбента полностью покрыта адсорбционным слоем, то возможно объединить их. Объединенная модель называется моделью Снайdera-Сочевинского. Для этой модели зависимость удерживания от концентрации полярной добавки в ОФ ВЭЖХ можно описать с помощью уравнения [3]:

$$\lg k = a - n \cdot \lg N \quad (4)$$

где k – фактор удерживания сорбата, N – мольная доля полярной добавки в элюенте, а и n – константы.

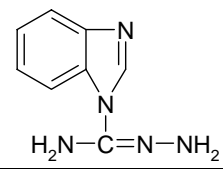
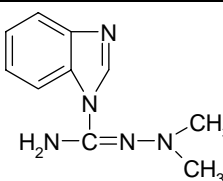
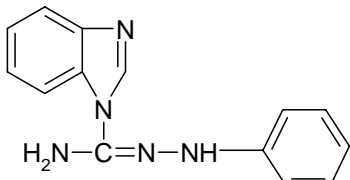
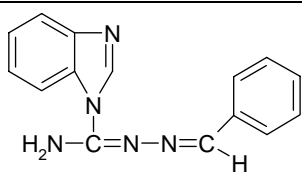
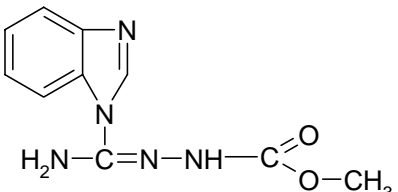
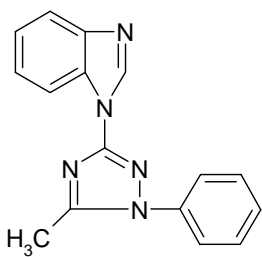
## Эксперимент

Анализ исследуемых соединений проводили в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе "Милихром-1" со спектрофотометрическим детектором при длине волны 254 нм. Применяли колонку Ultrasep ES 100RP18 (120×4 мм, диаметр частиц 4 мкм) с привитыми октадецильными группами. В качестве подвижной фазы использовали смесь

ацетонирил-вода с различными объемными соотношениями. Пробы готовили растворением кристаллических образцов в воде и ацетонитриле. Объем вводимых проб составил 4 мкл, при скорости расхода подвижной фазы 100 мкл/мин. В качестве несорбирующегося вещества использовали нитрит натрия.

Объектами исследования служили впервые синтезированные азотсодержащие гетероциклические соединения. Структурные формулы и названия исследуемых соединений приведены в таблице 1.

Таблица 1. Структурные формулы исследуемых соединений

| № соединения | Структура соединения  | Название соединения   |
|--------------|---|---|
| 1            |    | 1H-бензимидазол-1-карбогидразонамид   |
| 2            |    | N <sup>1</sup> ,N <sup>1</sup> -диметил-1H-бензимидазол-1-карбогидразонамид |
| 3            |   | N <sup>1</sup> -фенил-1H-бензимидазол-1-карбогидразонамид                   |
| 4            |  | N <sup>1</sup> -бензилиден-1H-бензимидазол-1-ил карбогидразонамид           |
| 5            |  | N <sup>1</sup> -карбметокси-1H-бензимидазол-1-ил карбогидразонамид          |
| 6            |  | 3-(1H-бензимидазол-1-ил)-5-метил-1-фенил-1H-1,2,4-триазол                   |

Факторы удерживания исследуемых соединений, полученные для различных подвижных фаз, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Факторы удерживания исследуемых соединений

| № | Соотношение ацетонитрил:вода, об.% |       |       |       |       |       |       |       |
|---|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|   | 80:20                              | 70:30 | 60:40 | 50:50 | 40:60 | 30:70 | 20:80 | 10:90 |
| 1 | 3,06                               | 4,01  | 4,15  | 4,32  | 4,36  | 4,47  | 4,53  | 5,20  |
| 2 | 3,42                               | 4,5   | 5,21  | 5,25  | 5,42  | 7,20  | 9,37  | 10,32 |
| 3 | 3,13                               | 4,31  | 4,49  | 6,03  | 6,23  | 7,41  | 8,00  | 12,16 |
| 4 | 3,53                               | 4,35  | 6,04  | 7,375 | 10,31 | -     | -     | -     |
| 5 | 2,40                               | 3,47  | 3,52  | 3,57  | 4,04  | 4,17  | 5,06  | 9,10  |
| 6 | 4,49                               | 5,53  | 7,27  | 11,05 | 21,57 | -     | -     | -     |

### Обсуждение результатов

Для исследуемых азолов были построены графики зависимости логарифма фактора удерживания ( $\lg k$ ) от логарифма мольной доли модификатора подвижной фазы ( $\lg X_m$ ). Значения  $\lg X_m$   $\lg k$  приведены в таблице 3. Ниже приведены расчетные параметры линейного уравнения Снайдера – Сочевинского для исследуемых соединений.

Таблица 3. Значения логарифмов мольной доли модификатора и логарифмов факторов удерживания исследуемых азолов

| $\lg X_m / \lg k_i$ | -0,238 | -0,352 | -0,469 | -0,593 | -0,730 |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| $\lg k_1$           | -0,388 | -0,072 | -0,040 | -0,004 | 0,003  |
| $\lg k_2$           | -0,240 | 0,031  | 0,146  | 0,151  | 0,176  |
| $\lg k_3$           | -0,355 | -0,006 | 0,028  | 0,249  | 0,272  |
| $\lg k_4$           | -0,030 | 0,002  | 0,251  | 0,380  | 0,574  |
| $\lg k_5$           | -0,975 | -0,222 | -0,206 | -0,190 | -0,064 |
| $\lg k_6$           | 0,029  | 0,189  | 0,371  | 0,612  | 0,951  |

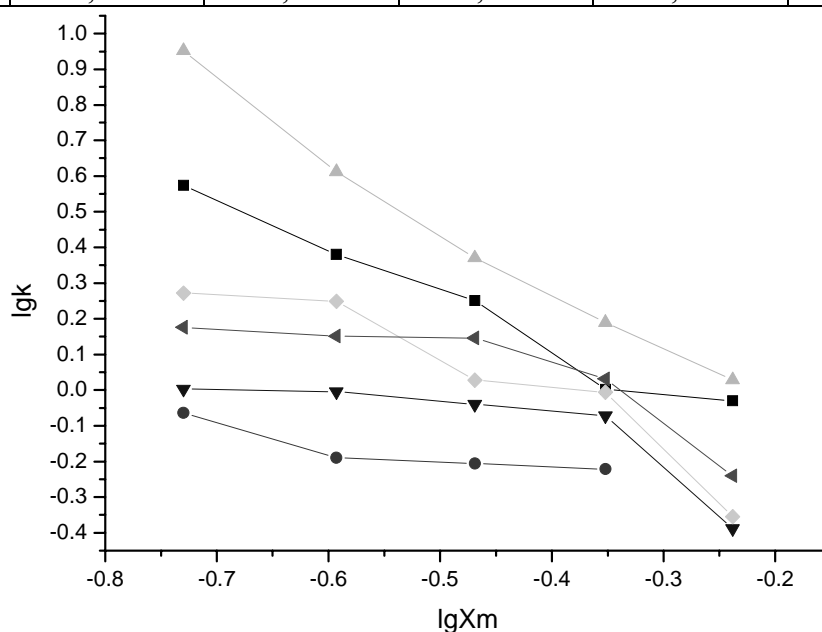
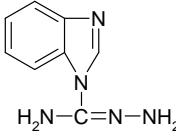
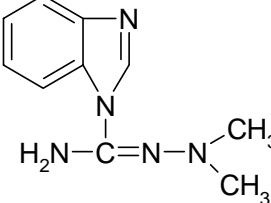
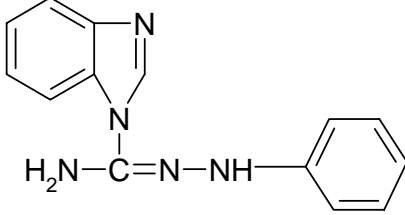
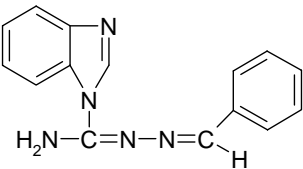
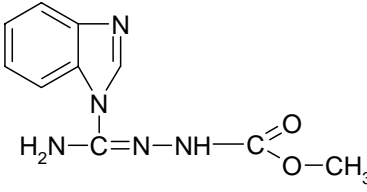
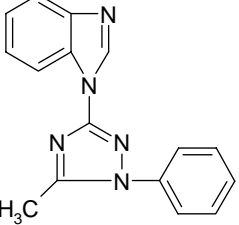


Рис. 1 Зависимость между логарифмом фактора удерживания и логарифмом мольной доли модификатора для исследуемых азолов

В модели Снайдера-Сочевинского коэффициент  $n$  показывает, какое количество молекул органического модификатора вытесняется в объемную фазу с поверхности сорбента одной молекулой сорбата. Для исследуемых азолов значения коэффициента  $n'$  изменяются в пределах от одного до двух. Увеличение объема молекулы связано с увеличением  $n$ . Однако, коэффициент  $n'$  для соединения 5 больше, чем для соединения 4, хотя объем молекулы соединения 4 больше объема молекулы соединения 5. Это можно объяснить тем, что дипольный момент для соединения 4 ( $\mu = 3,47$ ) больше, чем для соединения 5 ( $\mu = 2,34$ ). То есть соединение 4 более склонно к специфическим взаимодействиям с подвижной фазой и менее склонно к неспецифическим взаимодействиям с неподвижной фазой.

Таблица 4. Коэффициенты уравнения Снайдера-Сочевинского для исследуемых азолов

| № соединения | Структура соединения   | a     | n     | r     |
|--------------|--|-------|-------|-------|
| 1            | <br><chem>Nc1c[nH]c1N=NN</chem>                 | 0,424 | 0,679 | 0,804 |
| 2            | <br><chem>CN(C)N=Cn1c[nH]c1</chem>             | 1,152 | 1,218 | 0,993 |
| 3            | <br><chem>Nc1c[nH]c1N=NNc2ccccc2</chem>       | 0,543 | 1,219 | 0,934 |
| 4            | <br><chem>Nc1c[nH]c1N=NN=Cc2ccccc2</chem>     | 0,383 | 1,297 | 0,985 |
| 5            | <br><chem>COC(=O)N=Cn1c[nH]c1</chem>          | 1,039 | 1,485 | 0,788 |
| 6            | <br><chem>CN1C=NN(C1)c2c[nH]c2c3ccccc3</chem> | 0,455 | 1,859 | 0,993 |

Значения  $n'$  можно также рассчитать квантово-механическим путем с помощью программы HyperChem 7.0. для этого проводится оптимизация геометрии исследуемой молекулы, на основе которой можно сделать вывод о пространственном строении молекулы. Молекулы соединений 1, 3, 4, 6 являются плоскими. Отношения площадей азольных колец сорбатов и молекулы ацетонитрила приведены в таблице 5.

Таблица 5. Отношение площадей азольных колец сорбатов и молекулы ацетонитрила

| № соединения | $n$ (полученное из уравнения Снайдера – Сочевинского) | $n$ (полученное квантово-механическим способом) |
|--------------|---|---|
| 1            | 0,68  | 1,09  |
| 2            | 1,22  | 0,95  |
| 3            | 1,22  | 1,09  |
| 4            | 1,30  | 1,82  |
| 5            | 1,49  | 0,95  |
| 6            | 1,86  | 1,73  |

Из таблицы видно, что значения  $n$  для соединений 4 и 9 практически совпадают. Обе эти молекулы являются плоскими и имеют достаточно большие значения поляризуемости ( $\alpha = 31,39$  и  $\alpha = 29,55$ , соответственно), то есть площадь соприкосновения этих молекул с сорбентом будет большой и молекулы ложатся на сорбент всей своей поверхностью. Молекулы 1 и 7 также являются плоскими, но значения  $n$ , рассчитанных двумя способами, для них не совпадают. Это можно объяснить меньшими значениями поляризуемости этих соединений по сравнению с соединениями 4 и 9. Квантово-механические значения  $n$  соединений 1 и 7 оказываются больше, чем  $n'$  по Снайдеру-Сочевинскому. Таким образом, на расположение молекул этих соединений влияют ориентационные взаимодействия с подвижной фазой.

## Заключение

Исследовано хроматографическое поведение впервые синтезированных азотсодержащих гетероциклических соединений в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Построены зависимости между логарифмом фактора удерживания и логарифмом мольной доли модификатора в подвижной фазе. На основе построенных зависимостей получены значения коэффициента  $n$  из уравнения Снайдера-Сочевинского. Значения коэффициента  $n$  свидетельствуют о том, что одна молекула исследуемого соединения может вытеснять 1-2 молекулы модификатора с поверхности сорбента. Сделаны выводы о преимущественной ориентации молекул сорбатов на поверхности сорбента, главным образом азольными кольцами.

## Список литературы

1. Буланова А.В., Полякова Ю.Л. Хроматография в медицине и биологии. Самара. Изд-во: «Самарский университет», 2003. с.54.

2.Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / Под ред. А. Хеншен и др. – М.: Мир, 1988. – 688 с.

3.Соловова Н.В., Курбатова С.В., Белоусова З.П., Осокин Д.П. Жидкостная хроматография некоторых производных пятичленных гетероциклов // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. 2002. №4 (26). – С. 113-119.

4.Соловова Н.В., Курбатова С.В., Белоусова З.П. Хроматографическое поведение некоторых производных азотистых гетероциклов. // Журн. физ. химии. 2004. – Т. 78. №1. – С.91-95.

---

**Комиссарова Наталья Валентиновна** - аспирант кафедры общей химии и хроматографии СамГУ

**Буланова Анджела Владимировна** - д.х.н., профессор кафедры общей химии и хроматографии СамГУ, Самара

**Пурьгин Петр Петрович** - д.х.н., профессор кафедры органической химии СамГУ, Самара,

**Соколов Андрей Владимирович** - к.х.н., ассистент кафедры органической химии СамГУ, Самара

**Komissarova Natalya V.** - aspirant of the Common Chemistry and Chromatography Chair's SSU, Samara

**Bulanova Andgela V.** - d.c.s, professor of the Common Chemistry and Chromatography Chair's SSU, Samara

**Purygin Petr P.** - d.c.s., professor of the Organic Chemistry Chair's SSU, Samara

**Sokolov Andrei V.** - c.c.s., assistant of the Organic Chemistry Chair's SSU, Samara



УДК 661.183.6: 544.72

## Метод спинового рН зонда в исследовании мезопористого молекулярного сита SBA-15

Головкина Е.Л., Ковалева Е.Г., Молочников Л.С.

*Уральский государственный лесотехнический университет, г. Екатеринбург*

Хартман М.

*Университет г. Аугсбурга, Аугсбург, Германия*

Говиндасами Ч.

*Технический университет, г.Кайзерслаутерн, Германия*

Григорьев И.А., Кирилук И.А.

*Новосибирский институт органической химии им. Н.Н.Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск*

### Аннотация

С помощью рН чувствительных нитроксильных радикалов (НР) исследованы кислотно-основные свойства и электрический потенциал поверхности каналов мезопористого молекулярного сита SBA-15. Показано, что измерения с помощью разных НР приводят к одним и тем же значениям рН и что рН внутри каналов сита ниже рН внешнего раствора. Установлено существование на поверхности каналов силанольных и силандиольных групп, измерены их константы диссоциации. С помощью адсорбированных поверхностью сита молекул НР измерен электрический потенциал, создаваемый поверхностью в месте размещения радикальных фрагментов. Показано, что в процессе титрования омывающего частицы сита водного раствора по мере его подкисления заряд поверхности меняется с отрицательного на положительный; определена изоэлектрическая точка поверхности. Измерены значения электрического потенциала вблизи внешней границы слоя Штерна.

**Ключевые слова:** мезопористые молекулярные сита, электрический потенциал поверхности, кислотно-основные свойства, спиновые зонды, моделирование ЭПР спектров.

The acid-base property and electric potential of a surface of channels of mesoporous molecular sieve SBA-15 are investigated with application pH sensitivity nitroxide radicals (NR). It is shown, that measurements by different NR lead to the same values pH and that pH in channels of sieves low pH an external solution. Existence on a surface of channels silanol and silandiol groups is established, their ionization constants are measured. The electric potential, created by a surface in a place of placing of radical fragments, is measured by molecules of a radical which adsorbed by a surface of sieve. It is shown, that charge of surface varies with negative on positive in the process of titration of a solution washing the sample in process of it acidation; the isoelectric point of a surface is defined. Values of electric potential near to external border of a layer of Stern are measured.

### Введение

С недавнего времени, мезопористые материалы привлекают к себе все больше внимания как потенциальные материалы для катализа, разделения и адсорбции молекул [1-3]. Такие материалы имеют постоянную структуру одинаковых каналов с диаметром пор в пределах от 2 до 30 нм и объемом пор около 1 см<sup>3</sup>/г. Размер пор



таких материалов может меняться при изменении условий синтеза (например, температуры синтеза, вида введенного прекурсора и т.д.). Мезопористые материалы обладают развитой удельной поверхностью (500-1000 м<sup>2</sup>/г) и незначительной внешней поверхностью. Эти характеристики определяют высокую селективность и избирательность катализаторов и адсорбентов на их основе при незначительном влиянии процессов, происходящих на внешней поверхности.

Каталитические и адсорбционные свойства молекулярных сит зависят от химической природы растворителя и специфических условий внутри каналов и на поверхности материалов. Поэтому измерения локального значения рН для определения кислотно-основных характеристик мезопористых материалов и электрического потенциала вблизи поверхности представляют собой большой практический интерес в области гетерогенного катализа и химии адсорбционных процессов.

Нами был использован разработанный ранее метод определения кислотности среды внутри пор ( $\text{pH}^{\text{loc}}$ ) твердых объектов с использованием ЭПР и рН-чувствительных нитроксильных радикалов (НР) в качестве зондов. Этот метод позволяет [4]: 1) определить  $\text{pH}^{\text{loc}}$  в микропорах большого класса органических сшитых полиэлектролитов и константы ионизации их функциональных групп; 2) изучить процессы сорбции и гидролиза в ионообменных смолах и каталитические свойства  $\text{Cu}^{2+}$ -содержащих карбоксильных катионообменных смол.

Объектом исследования был мезопористый молекулярный материал типа SBA-15[5].

Были выдвинуты следующие задачи исследования:

- оценить возможность применения упомянутого выше метода разработанного для органических объектов для исследования неорганических материалов, в частности, мезопористого молекулярного сита SBA15;
- измерить локальное значение кислотности внутри сита и константы ионизации функциональных групп SBA-15;
- изучить возможность использования рН-чувствительных нитроксильных радикалов для определения электрического потенциала поверхности неорганических материалов.

## Эксперимент

### *Объекты исследования*

Образцы мезопористого молекулярного сита типа SBA-15 были синтезированы в Германии в группе проф. М.Хартмана (Технический университет, г.Кайзерслаутерн), используя амфифильный триблоксополимер полиэтиленгликоль-блок-полипропиленгликоль-блок-полиэтиленгликоль (Pluronic P123, молярная масса 5800 г/моль,  $\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$ ) как прекурсор [6,7].

Полученный гель выдерживается сутки при 313 К, а затем нагревается до 373 К и выдерживается при этой температуре еще одни сутки. Приготовленные таким образом гели затем кристаллизуются при различной температуре от 373 до 423 К. После синтеза, полученный твердый порошок прокаливается в потоке кислорода при температуре от 813 К для удаления триблоксополимера

Рентгеновские спектры порошков регистрировались на дифрактометре Сименс В5005 с использованием  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda=0.154$  нм) излучения. Химический состав синтезированных образцов был определен с помощью атомно-адсорбционной спектроскопии (ААС). Изотермы адсорбции и десорбции азота были измерены при

77 К на Quantachrome Autosorb 1 сорбционном анализаторе. Перед адсорбционными измерениями синтезированный образец был дегазирован при температуре 513 К в течение 3 часов. Удельная поверхность образца, средний диаметр каналов и суммарный объем пор были рассчитаны методом БЕТ.

Аттестация синтезированного образца SBA-15 показала, что он имеет поры в виде каналов диаметром 8,1 нм, удельную поверхность  $0,55 \cdot 10^3 \text{ м}^2/\text{г}$  и суммарный объем пор  $11,7 \cdot 10^{-1} \text{ см}^3/\text{г}$ .

#### *pH зонды*

Для исследований использовались стабильные pH-чувствительные нитроксильные радикалы имидазолинового типа: 4-диметиламин-2-этил-5,5-диметил-2-пиридин-4-ил-2,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-оксил и 4-диметиламин-2-этил-5,5-диметил-2-фенил-4-ил-2,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-оксил (большие по размеру НР, R1 и R2, соответственно) и 4-амино-2,2,5,5-тетраметил-2,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-оксил (маленький НР, R3), которые проявляют pH чувствительность в пределе от 2.5 до 7 единиц pH (таблица 1). Нитроксильные радикалы, использованные в исследовании, были синтезированы в Институте органической химии СО РАН (Новосибирск) [8,9]. Размеры молекул радикалов были определены методом молекулярной механики с помощью программы HiperChem Pro 6.03 (Hypercube Inc., 2000).

#### *Методики*

Навеску исследуемого сита заливали 0,1 мМ раствором нитроксильного радикала, в соотношении 1г:100мл. Ионная сила раствора 0,1 создавалась введением KCl.

Таблица. Характеристики НР, использованных в работе

| Обозначение | Формула | pK  | Размеры, Å<br>д × в × г | $a_N \pm 0,05, \text{ Гс}$ |       |
|-------------|---------|---|-------------------------|----------------------------|-------|
|             |         |   |                         | RH <sup>+</sup>            | R     |
| R1          |         | $pK_{a1}=2,9$<br>2,<br>$pK_{a2}=5,0$<br>6 | 7,1 x 6,7 x<br>7,1      | 13,94                      | 15,2  |
| R2          |         | $pK_a=5,9$                                | 7,1 x 6,6 x<br>7,2      | 14,62                      | 15,46 |
| R3          |         | $pK_a=6,1$                                | 6,2 x 5,4 x<br>4,4      | 14,96                      | 15,76 |

Затем залитые образцы выдерживались до установления динамического равновесия внешнего раствора НР и раствора внутри каналов. Концом установления равновесия мы считали постоянное значение рН раствора радикала, омывающего образец. Изменяя рН внешнего раствора НР ( $pH_{вн}$ ), меняли рН раствора внутри каналов.  $pH_{вн}$  измерялся с помощью комбинированного электрода 340 рН meter (Corning Inc., N.Y.). Погрешность измерений составляла 0.01 единицу рН.

Затем образец SBA-15 отделяли от раствора с помощью фильтрации. Для определения кислотности внутри каналов использовали метод спинового зонда [10-12].

#### Регистрация и обработка спектров ЭПР

Регистрация спектров ЭПР нитроксильных радикалов в растворе и в каналах исследуемого ММС проводилась на Bruker ElexSys 580 pulsed FT-ESR и автоматическом ADANI PC-100.X (Беларусь) спектрометрах в трехсантиметровом диапазоне длин волн при температурах 293 К и 77 К. Регистрация спектров ЭПР НР в каналах образца проводилась в незапаянных кварцевых ампулах с внутренним диаметром 3.5 мм, а спектров ЭПР растворов с использованием кварцевого капилляра.

Характерные спектры ЭПР рН-чувствительных нитроксильных радикалов в водном растворе при 293 К приведены на рисунке 1а, а при 77 К на рисунке 1б. Для съемок при 77 К в водные растворы вводили до 20 % объемных глицерина с целью получения низкотемпературных стекол.

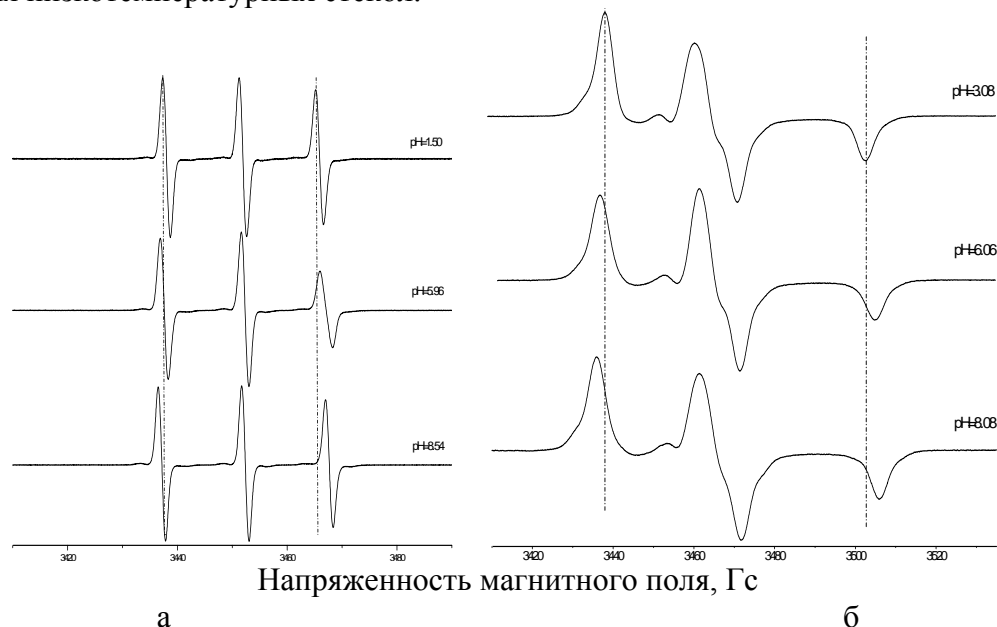


Рис.1. Типичные спектры ЭПР 0,1 мМ раствора нитроксильного радикала R1 при 293 К (а) и 77 К (б) при различных рН раствора. Ионная сила раствора 0,1

Спектр НР состоит из трех компонент, характеризующих взаимодействие между неспаренным электроном и ядерным спином азота ( $I=1$ ), принадлежащего  $=N-O^{\bullet}$  группе радикала.

Из рисунка 1 видно, что молекулы НР в водном растворе при 293 К и 77 К имеют различную подвижность. Быстро движущиеся молекулы радикала дают изотропный спектр ЭПР, а медленно движущиеся – анизотропный. В первом случае частота вращения НР очень велика и время корреляции ( $\tau_c$ ) при 293 К около  $10^{-11}$  с. В случае с замороженным раствором наоборот,  $\tau_c$  порядка  $10^{-7}$  с.

В зависимости от pH раствора НР может находиться в протонированной ( $\text{RH}^+$ ), депротонированной (R) и промежуточной (смешанной формах). Так как константы СТВ для этих форм различны (таблица 1), то с ростом pH в спектре ЭПР НР происходит увеличение расстояния между первой и второй компонентами триплета  $a$  (рисунок 1а). Поэтому параметр  $a$  является pH-чувствительным параметром изотропного спектра ЭПР.

Из рисунка 2 видно, что спектры НР в каналах сита представляют собой суперпозицию изотропного и анизотропного сигнала. В качестве pH-чувствительного параметра анизотропного спектра ЭПР использовался параметр  $f$ , представляющий собой долю депротонированных молекул медленно движущегося НР. Значение параметра  $f$  определялось моделированием экспериментальных спектров с помощью программы Дж.Фрида и др. [13].

Первым шагом процесса моделирование было определение параметров спин гамильтониана и характеристик вращения НР в протонированной ( $\text{pH}_{\text{внеш}} \approx 1.5$ ) и в депротонированной ( $\text{pH}_{\text{внеш}} \approx 9$ ) формах в каналах сита. В этих крайних точках спектр ЭПР представлял собой суперпозицию лишь двух сигналов: быстрый и медленный в шкале времен корреляции либо протонированной ( $\text{RH}^+$ ), либо депротонированной (R) форм НР. Остальные спектры ЭПР НР в каналах исследуемого сита SBA-15 (от 1,5 до 9 ед. pH) представляли собой суперпозиции четырех сигналов НР: быстрый и медленный в шкале времен корреляции  $\text{RH}^+$  формы, быстрый и медленный R формы.

Однако, программа [13] позволяет использовать для моделирования экспериментального спектра только три теоретических спектра. Поэтому, полученные в ходе эксперимента при  $1,5 < \text{pH} < 9$  спектры ЭПР НР в каналах SBA-15, мы моделировали с помощью следующих трех сигналов: сигнала от медленно движущихся молекул НР в протонированной форме, сигнала от медленно движущихся молекул радикала в депротонированной форме и усредненного сигнала от быстро движущихся молекул радикалов.

Конечно, рассчитанные в результате этой процедуры параметры спин-гамильтониана усредненного изотропного сигнала, представляющего собой суперпозицию сигналов быстро движущихся молекул радикала в протонированной и депротонированной формах, не имеют физического смысла. Всю необходимую информацию о быстро движущихся молекулах НР мы получали прямыми расчетами pH-чувствительного параметра  $a$  из спектров ЭПР.

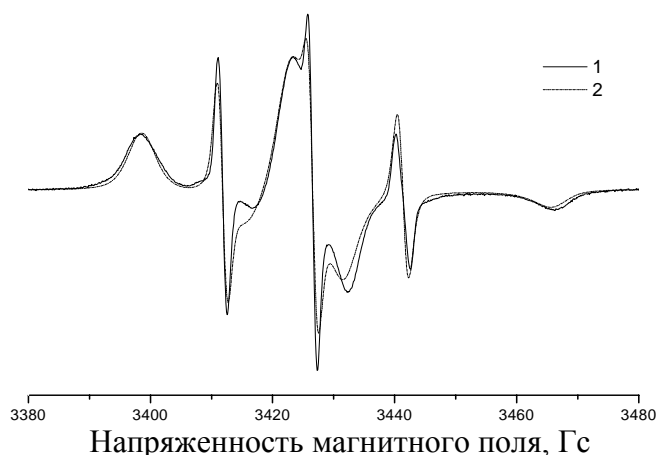


Рис.2. Типичный спектр ЭПР R1 в каналах сита при 293 К и pH=6,22: 1 - экспериментальный, 2 - смоделированный с помощью программы Дж.Фрида и др.

Отметим, что полного совпадения экспериментальных и расчетных спектров с помощью программы Фрида добиться не удалось (рисунок 2). Погрешность в определении доли быстро движущихся радикалов и доли депротонированной формы радикала с помощью проведенного моделирования не превышает по нашим оценкам 2-3%.

Проводя титрования водных растворов радикалов и измеряя величину  $a$ , были построены градуировочные кривые  $a=F(\text{pH})$  для каждого радикала (рисунок 5). Кривые титрования молекул НР в каналах исследуемого молекулярного сита приведены на рисунках 4 и 5. По градуировочным кривым определяли  $\text{pH}^{\text{loc}}$  внутри каналов.

## Обсуждение результатов

### *Анализ ЭПР спектров радикалов в SBA-15*

В большинстве случаев спектр ЭПР НР в каналах SBA-15 представляет собой суперпозицию изотропного и анизотропного сигналов (рисунок 2), что указывает на сосуществование двух типов молекулярной подвижности использованных НР в каналах материала. Об аналогичном сосуществовании двух сигналов от нитроксильных радикалов, участвующих в быстром и медленном движении в силикагелях сообщалось ранее в работах Мартини [14-17] и Р.И.Самойлова [18,19]. Наоборот, М.Оказак и К.Торияма [20-24] внутри сит МСМ-41 в воде и других растворителях наблюдали при комнатной температуре только сигнал медленно движущихся радикалов. Использованный ими способ наполнения каналов сита раствором радикала предполагал заполнение каналов более чем на 80% (рассчитано из увеличения веса порошка МСМ-41 и свободного объема) [21]. Имеющееся очевидное несоответствие вида наших спектров (числа сигналов) с данными М. Оказак и К.Торияма мы объясняем именно использованием различных способов наполнения каналов. К.Моришидже и К.Нобуока [25] при исследовании замороженной и растаявшей воды в молекулярном сите типа МСМ-41 показали, что количество воды на границе на 65% больше количества воды в порах образца с диаметром приблизительно 3 нм. Вероятно, авторы [21] имели дело лишь со связанной водой и размещенные в ней молекулы радикалов давали только ЭПР сигнал медленно движущихся радикалов.

При высоких значениях  $\text{pH}$  ( $\text{pH} \geq 10$ ), когда поверхность сита заряжена отрицательно, а радикалы перешли в депротонированную форму, все поглощенные ситом радикалы вне зависимости от их размеров дают ЭПР спектр, характерный для быстрого движения. Такое же исчезновение сигнала от радикалов, совершающих медленное движение, наблюдалось Мартини и др. [16] при переходе от положительно заряженных и электронейтральных к отрицательно заряженным спиновым зондам. Этот эффект объяснен авторами взаимным отталкиванием отрицательно заряженных зондов и отрицательно заряженной поверхности силикагеля. Причины имеющего место в нашем случае выталкивания электронейтральных зондов из узкого приповерхностного слоя отрицательно заряженного сита нам не ясны. Поскольку вне зависимости от размеров все использованные радикалы с ростом  $\text{pH}$  дают спектры быстрого движения, то, следовательно, не ограниченность их подвижности из-за узости каналов сита является ответственной за медленное движение. Мартини с соавторами [17] пришли к выводу, что наблюдаемые сигналы медленного движущихся молекул радикала должны скорее всего объясняться уменьшением подвижности воды, чем прямым

взаимодействием спинового зонда с поверхностью силикагеля. Их вывод основан на легкости и вымывания водой зондов из изученных силикагелей. Проведенные нами опыты по вымыванию радикала R1 из молекулярных сит с существенно меньшими размерами диаметра каналов ( $d=2,3$  нм в C12MCM-41 и  $d=3,2$  нм в C16MCM-41) показали [26], что при высоких pH ( $pH=10,9$ ) R1 вымывается полностью относительно малыми объемами водных растворов с теми же ионной силой и значением pH, при которых данный образец насыщался радикалом. При понижении значения pH вымывающего раствора до pH 8,64 (R1 продолжает оставаться в электронейтральной форме) вымывание радикала из сит затруднено и для полного его вымывания требуется пропустить существенно больший объем раствора. Этот факт указывает на различие характера взаимодействия молекул радикала с поверхностью каналов сита при  $pH=10,9$  и 8,64. С другой стороны, при  $pH=4,2$  около 30% содержащегося в C12MCM-41 радикала водным раствором не вымывается. Поэтому мы считаем, что, по крайней мере, для части зондов причиной медленного движения является их прямое взаимодействие с поверхностью.

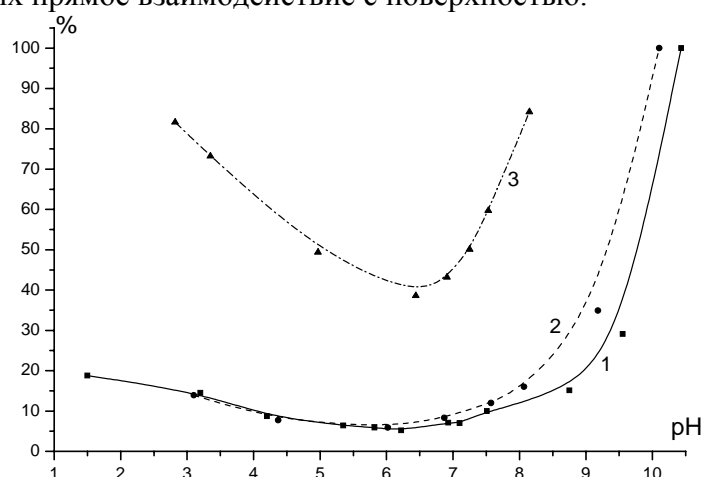
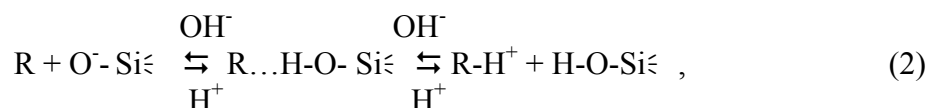
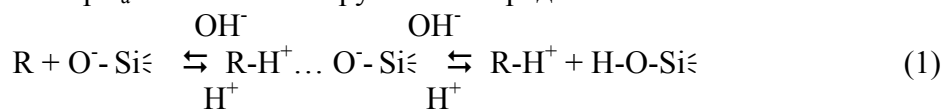


Рис.3. Зависимость доли быстро движущихся молекул радикалов в SBA-15 от pH раствора, омывающего сито при 293 К: 1 – R1, 2 – R2, 3 – R3

Зависимости доли быстрого движения от pH (рисунок 3) имеют чашеобразную форму. Особенно явно это проявляется для радикала R3. С уменьшением щелочности и ростом кислотности доля быстрого движения сначала резко убывает, а затем, пройдя через минимум, возрастает. По нашему мнению, такой ход зависимостей отражает равновесия типа (1) или (2), отличающиеся соотношением значений  $pK_a$  силанольных групп сита и радикалов:



где  $R - H^+$ ,  $H - O - Si \begin{array}{c} OH^- \\ \rightleftharpoons \\ H^+ \end{array}$  и  $R$ ,  $O^- - Si \begin{array}{c} OH^- \\ \rightleftharpoons \\ H^+ \end{array}$  - протонированные и депротонированные формы радикалов и силанольных групп поверхности сита соответственно.

Равновесия (1) соответствуют случаю, когда  $pK_a$  силанольных групп меньше  $pK_a$  радикала. Равновесия (2) описывают противоположное соотношение. Для формирования водородных связей между радикалами и силанольными группами радикалы должны размещаться в непосредственной близости от поверхности, т.е.

должны быть втянуты из центральной части каналов сита в приповерхностный адсорбционный слой. Их подвижность существенно ограничивается и, в силу этого, доля радикалов, совершающих быстрое движение, резко падает.

С ростом кислотности по мере перехода в протонированную форму и радикалов и силанольных групп поверхности сита радикалы перестают взаимодействовать с силанольными группами и, соответственно, растет доля быстро движущихся радикалов. Однако известно [27], что точка нулевого заряда поверхности для кремнеземов на несколько единиц pH ниже  $pK_a$  силанольных групп. Поэтому электростатическое взаимодействие между остающейся отрицательно заряженной поверхностью сита и положительно заряженными радикалами, перешедшими в  $RH^+$  форму, должно иметь место. Именно поэтому доля быстро движущихся радикалов возрастает не столь быстро, как это должно было бы происходить при положительной перезарядке поверхности и отталкивании от нее радикалов в протонированной форме.

Для радикалов R1 и R2, возможно, из-за их больших размеров, доля быстро движущихся радикалов с ростом кислотности увеличивается медленнее, чем для радикала R3. Кроме того, для радикала R3 эта доля принципиально больше и в сите SBA-15 составляет более 40%. Если бы взаимодействие поверхностных групп с радикалами осуществлялось за счет одинаковых у всех них атомов азота в третьем положении имидазольного фрагмента или азотов боковой цепи четвертого положения, то доли быстрого движения всех этих радикалов были бы примерно одинаковы. Отмеченное же выше различие может быть объяснено взаимодействием с поверхностью именно пиридинового и фенильного фрагментов радикалов R1 и R2. Помимо гидрофильных силанольных групп поверхность сит имеет и значительные гидрофобные участки, что позволяет ситам хорошо сорбировать как аммиак и пиридин, так и бензол [28, 29].

*Измерение электрического потенциала вблизи поверхности сита.*

Обсуждаемые в этом разделе экспериментальные данные получены из анализа ЭПР спектров медленно движущихся радикалов в SBA-15.

Хорошо известно [30], что в приповерхностном слое вода испытывает значительные ограничения в подвижности, и ее свойства существенно отличаются от «объемной» воды. Особенности структурно-механических свойств воды в граничных слоях могут обуславливаться как кулоновскими, так и другими молекулярными силами. Электрическое поле поверхности влияет на свойства граничных слоев как потому, что оно ориентирует и поляризует молекулы воды, так и вследствие того, что оно способствует увеличению суммарной концентрации ионов электролита вблизи поверхности [31]. Раствор в приповерхностном слое, составляющем приблизительно 0,5 нм [32], существует в виде беспорядочно распределенных кластеров, формально отдаленных друг от друга [33,34]. Понятно, что молекулы радикалов в приповерхностном слое испытывают влияние иначе организованного растворителя по сравнению с внешним водным раствором и «объемной» водой внутри каналов. Следовательно, кривая титрования водного раствора радикала при комнатной температуре (градуировочная кривая) малопригодна для сопоставления с кривой, построенной на основании расчета доли депротонированной формы «медленно» движущихся молекул радикала (молекул радикала в приповерхностном слое). Сопоставление этой кривой с аналогичной кривой для радикала в застеклованном при 77 К водном растворе (внешний вид спектра представлен на рис. 16) тоже может являться лишь оценочным, поскольку структура застеклованного водного раствора принципиально отличается от воды в приповерхностном слое [25,33,35].

Сопоставление кривой титрования молекул радикала R1 в приповерхностном слое исследуемого сита (кривая 2) с градуировочной кривой (рис. 4) позволяет выделить на ней несколько характерных участков. В диапазоне pH внешнего раствора 3,6÷4,6 кривая 2 идет параллельно градуировочной кривой, что, по-видимому, соответствует близости к нулю электрического заряда на поверхности сита. В приведенных ниже расчетах мы именно этому участку кривой титрования приписывали изоэлектрическую точку поверхности сита, то есть считали, что  $\Psi = 0$  В.

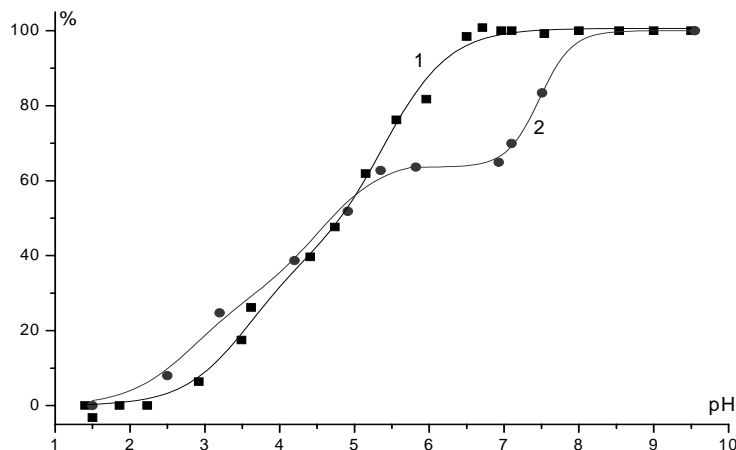


Рис.4. Кривые титрования R1 в водном растворе (1) и в приповерхностном слое каналов SBA-15 (2) при 293 К

Горизонтальный участок кривой 2 отражает процесс титрования поверхностных силанольных групп (нарастание плотности отрицательного заряда) и изменение  $pK_a$  радикала под влиянием роста электрического потенциала поверхности каналов.

Возможность такого влияния обсуждалась в [36-40]. Показано, что сдвиг  $pK_a$  можно представить в виде двух слагаемых:

$$\Delta pK_a = \Delta pK_a^{el} + \Delta pK_a^{pol}, \quad (3)$$

где  $\Delta pK_a^{el}$  является вкладом, учитывающим электрический потенциал поверхности частицы ( $\Psi$ ), а вклад  $\Delta pK_a^{pol}$  возникает за счет уменьшения полярности в месте иммобилизации pH зонда по сравнению с полярностью свободной воды. Формулы для расчета величины отдельных вкладов имеют вид:

$$\Delta pK_a^{el} = -F\Psi/2,3RT \quad (4)$$

$$\Delta pK_a^{pol} = b(\varepsilon - \varepsilon_{H_2O}), \quad (5)$$

где  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость среды,  $\varepsilon_{H_2O}=81$ ,  $R$  – газовая постоянная,  $T$  – температура,  $F$  – число Фарадея,  $b$  – эмпирический числовой коэффициент.

Анализ формул показывает, что сдвиг кривой титрования вправо за счет изменения  $pK_a$  радикала может быть связан только с отрицательным зарядом поверхности сита. Кроме того, совпадение (рис. 5) значений  $a$  протонированной и депротонированной форм радикалов внутри каналов сита и во внешнем растворе указывает на одинаковые значения диэлектрической проницаемости среды в месте нахождения радикалов [39,41] и, следовательно, что  $\Delta pK_a^{pol} = 0$ .

После окончания титрования силанольных групп с ростом pH кривая 2 идет параллельно градуировочной кривой 1, что указывает на неизменность  $\Psi$  в диапазоне чувствительности радикала. Расчет по формуле (4) дает значение  $\Psi = -109$  мВ. Полученные значения отражают величины электрического потенциала в месте



нахождения радикального фрагмента N-O<sup>•</sup> молекул радикала R1. Результатом аналогичных измерений по кривой титрования радикала R2 является значение  $\Psi = -141$  мВ.

При рН внешнего раствора несколько меньше 3,6 параллельность кривой 2 градуировочной кривой нарушается, и она резко смещается влево. Сдвиг кривой влево указывает (4) на появление положительных зарядов на поверхности сита. По результатам десорбции цитохрома из сита CNS (IEP=3,7) [42] тоже сделан вывод, что при рН ниже 4 поверхность сита приобретает положительный заряд и отталкивает положительно заряженный цитохром. Аналогичный результат наблюдался при низких значениях рН для анионообменных смол [4]. Выше уже упоминалась особенность поверхности кремнеземов [27,42], связанная с несовпадением изоэлектрической точки и рК<sub>а</sub> силанольных групп. Наши результаты полностью согласуются с этими данными.

Следует заметить, что рост отрицательного потенциала поверхности сита происходит при неизменном значении рН<sup>loc</sup>, что проявляется в постоянном значении доли депротонированной формы радикала (горизонтальный участок кривых титрования). В этом случае добавляемая при титровании щелочь расходуется на нейтрализацию силанольных групп, рК<sub>а</sub> которых является величиной постоянной для данного сита. Рост же положительного заряда поверхности при подкислении внешнего раствора сопровождается ростом доли протонированной формы молекул радикала (нет горизонтального участка на кривой титрования). Следовательно, положительный заряд приобретают активные центры, кислотно-основные свойства которых должны быть охарактеризованы различными рК<sub>а</sub>.

Поскольку кривая 2 с одной стороны и градуировочная кривая 1 – с другой (рис. 4) при рН ниже 3,6 идут не параллельно, то величина  $\Psi$  для положительно заряженной поверхности сита не остается постоянной, а зависит от рН раствора, при котором проводится измерение. Следует также учитывать, что измерения проводятся вблизи конца зоны чувствительности (восходящего участка кривой титрования) радикала R1. Рассчитанное для 10% доли депротонированной формы радикала R1 значение  $\Psi = 25$  мВ. Поскольку зона чувствительности радикала R2 лежит выше изоэлектрической точки сита (табл.1), то с его помощью измерения в этой области значений рН невозможны.

Поскольку установлено, что молекулы радикалов R1 и R2 адсорбируются поверхностью сита за счет взаимодействия с их пиридиновым (фенильным) фрагментом, то с учетом размеров молекул радикалов (табл. 1) можно оценить расстояние их радикального фрагмента от поверхности. Поскольку способ размещения пиридинового (фенильного) фрагментов по отношению к поверхности неизвестен, то оценка будет лишь приблизительной. Расстояние между кислородом радикального фрагмента и водородом протонированной пиридиновой группы или самым удаленным водородом фенильного кольца равняется примерно 0,7 нм. Это значение является верхним пределом удаленности радикального фрагмента от поверхности. На самом деле, по-видимому, пиридиновый (фенильный) фрагменты молекул радикалов вряд ли размещены так, чтобы линия, соединяющая их точку прикрепления к поверхности и кислород радикального фрагмента, располагалась по нормали к поверхности. Поэтому и с учетом размеров молекул радикалов и угла между плоскостями пиридинового (фенильного) и имидазолинового циклов (114°) кажется более реалистичной оценка этого расстояния как 0,3÷0,5 нм. Следовательно, измеренные значения  $\Psi$  отражают величину электрического потенциала вблизи внешней границы слоя Штерна. Именно эту величину электрического потенциала

испытывают молекулы внутри каналов молекулярного сита, не адсорбированные поверхностью и движущиеся вблизи слоя скольжения.

*Определение кислотности внутри SBA-15 и  $pK_a$  его функциональных групп*

Обсуждаемые в этом разделе экспериментальные данные получены из анализа ЭПР спектров быстро движущихся радикалов в каналах мезопористого молекулярного сита SBA-15.

На рисунке 5 представлены кривые титрования использованных в работе нитроксильных радикалов в растворе и в каналах исследуемого мезопористого сита.

Кривые титрования радикалов в каналах SBA-15 сдвинуты вправо относительно кривых титрования радикалов в растворе. Ранее было показано, что такой сдвиг ( $\Delta pH$ ) характерен для нейтрально и отрицательно заряженной матрицы органических сорбентов [4]. Сдвиг влево наблюдался при положительном заряде матрицы.

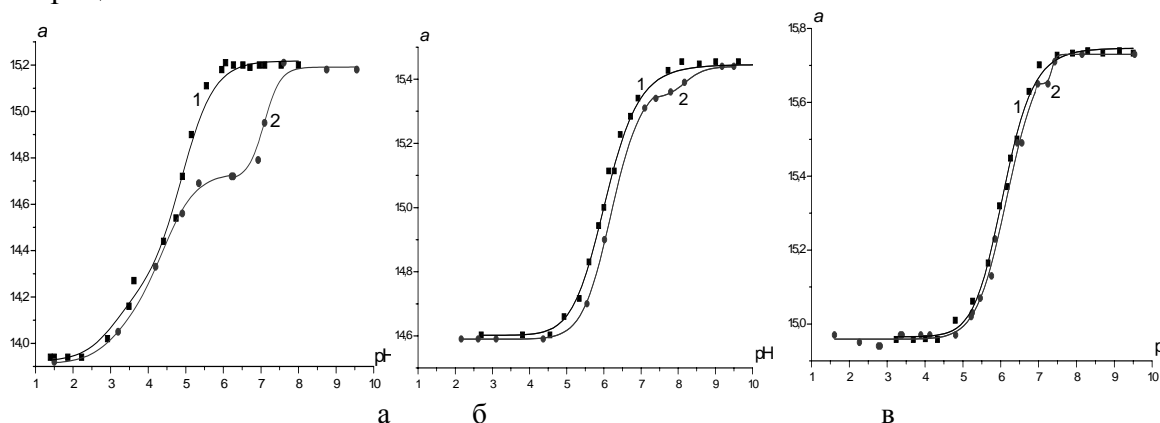


Рис. 5. Кривые титрования НР в водном растворе (1) и в каналах SBA-15 (2) при 293 К: а) R1; б) R2; в) R3

Величина диаметра каналов ( $2r_0$ ) играет определяющую роль в методике измерения  $pH^{loc}$ . Если диаметр так велик, что молекулы радикала, расположенные вблизи оси канала, не испытывают влияния  $\Psi$  и, как в нашем случае,  $\varepsilon$  остается неизменной, то расстояние между их кривой титрования и градуировочной кривой выражается соотношением:

$$pH^{loc} = pH_{вн} - \Delta pH \quad (6)$$

Условие большого диаметра, когда справедливо выражение (6), может быть записано [30] в виде соотношения:

$$\chi r_0 > 4 \quad (7)$$

Величина Дебаевского радиуса экранирования ( $\chi^{-1}$ ) рассчитывается по формуле:

$$\chi^{-1} = (\varepsilon \varepsilon_0 RT / 8\pi F^2 c)^{1/2}, \quad (8)$$

где  $\varepsilon_0$  – электрическая постоянная,  $c$  – молярная концентрация раствора сильного электролита. В записи выражения для  $\chi^{-1}$  учтено, что в качестве сильного электролита нами использовался раствор KCl и, следовательно, заряды ионов  $\pm 1$ .

В нашем эксперименте  $c=0,1$  моль/л,  $T=298K$ ,  $\chi^{-1}=0,978$  нм и  $\chi r_0$  приблизительно равно 4,14 для SBA-15. Поэтому применительно к данному объекту сдвиг кривых титрования, построенных по данным от изотропного сигнала, обусловлен лишь изменением pH внутри каналов. Влияние потенциала на сдвиг таких кривых титрования в образцах мезопористых молекулярных сит с меньшим размером каналов будет обсуждаться в последующих публикациях.

Из рисунка 5 видно, что значение  $pH^{loc}$  внутри каналов SBA-15 меньше, чем

значение pH внешнего раствора НР, омывающего образец. Следует отметить, что значения  $pH^{loc}$  при данном  $pH_{вн}$  оказываются одинаковыми при использовании для их определения разных НР.

Из рисунка 5 видно, что на каждой кривой титрования радикала в каналах присутствует горизонтальный участок, в пределах которого  $pH_{вн}$  возрастает, а значение параметра  $a$  остается постоянным. Напомним, что для каждого радикала существует своя область pH чувствительности.

Горизонтальный участок соответствует моменту диссоциации функциональных групп. Реакция диссоциации обеспечивает определенную буферность раствору внутри каналов и поддерживает постоянное значение  $pH^{loc}$ . Как было показано ранее [4], это значение  $pH^{loc}$  соответствует значению  $pK_a$  функциональных групп ионообменных смол. По аналогии можно заключить, что горизонтальные участки на кривых титрования радикалов в каналах SBA-15 соответствуют  $pK_a$  силанольных групп поверхности сита.

В работах [28,29,43] методом  $^{29}Si$  ЯМР было показано существование в ситах двух типов функциональных групп: силанольных  $Q_3$  ( $Si(O-Si)_3-OH$ ) и силандиольных  $Q_2$  ( $Si(O-Si)_2-(OH)_2$ ), являющихся гидрофильными сорбционными центрами на поверхности каналов сит. Там же отмечено, что количество силанольных групп значительно превышает количество силандиольных групп и общее их количество на поверхности каналов порядка 3 групп/нм<sup>2</sup> или с учетом площади поверхности каналов  $\sim 4\div 5$  ммоль/г. Недавно значения  $pK_a$  силанольных групп некоторых силикатных материалов были рассчитаны с помощью метода жидкостной хроматографии [44]. Было обнаружено, что существуют два типа силанольных групп с двумя константами ионизации  $pK_{a1}=4.65\pm 0.17$  и  $pK_{a2}=6.84\pm 0.07$  в образцах силикатов с размерами частиц 5 мкм, размером пор 9 нм, удельной поверхностью 341 м<sup>2</sup>/г и объемом пор 0,9 мл/г. Эти данные близки к значению  $pK_{a1}=4.90\pm 0.1$ , полученному нами при исследовании SBA-15 с помощью радикала R1. Значение  $pK_{a2}=6.92\pm 0.1$ , полученное с помощью радикалов R2 и R3, также близко к литературным данным.

## Заключение

Установлено, что  $pH^{loc}$  внутри каналов ниже  $pH_{вн}$  и измерения с помощью разных НР приводят к одним и тем же значениям  $pH^{loc}$ .

Измерены значения  $pK_a$  функциональных групп, расположенных на поверхности сита.

Доказана принципиальная возможность использования pH чувствительных НР для исследования электрического потенциала поверхности молекулярных сит. Измерены значения  $\psi$  вблизи внешней поверхности слоя Штерна. Отмечена перезарядка поверхности сита при изменении pH внешнего раствора и установлена ее изоэлектрическая точка. Установлено, что отрицательный заряд поверхности SBA-15 возникает в результате депротонирования силанольных и силандиольных группировок,  $pK_a$  которых остается постоянным в процессе диссоциации. Положительный же заряд поверхности сита обеспечивается активными центрами,  $pK_a$  которых зависит от кислотности среды и не остается постоянным.

Измеренное с помощью молекул радикала R2 значение потенциала  $\psi$  в SBA-15 оказалось на 30% выше, чем значение  $\psi$ , измеренное с помощью молекул радикала R1. Это возрастание потенциала связано, на наш взгляд, с ростом

заряженности поверхности в связи с депротонированием силандиольных функциональных групп поверхности сита. Диапазон чувствительности радикала R2 позволяет, как это было указано выше, зарегистрировать диссоциацию этих групп, а из-за ограничения диапазона чувствительности радикала R1 регистрация диссоциации силандиольных групп с его помощью невозможна.

*Работа выполнена при поддержке МБНФ им.К.И.Замараева.*

### Список литературы

1. C.T.Kresge, M.E.Leonowicz, W.J.Roth, J.C.Vartuli, J.S.Beck //Nature. 1992. 359, 710.
2. L.Washmon-Kriel, V.L.Jumenez, K.J.Balkus //J.Mol.Catal. B: Enzymatic. 2000. 10, 453.
3. J.Deere, E.Magner, J.G.Wall, B.K.Hodnett //Catal. Lett. 2003. 85,19.
4. L.S.Molochnikov, E.G.Kovalyova, I.A.Grigor'ev, A.A.Zagorodni //J. Phys. Chem. B, 2004. 108, 1302.
5. D.Zhao, J.Feng, Q.Huo, N.Melosh, G.H.Fredricson, B.F.Chmelka, J.D.Stucky //Science. 1998. 279, 548.
6. M.Hartman, A.Vinu //Langmuir. 2002. 18, 8010.
7. A.Vinu, V.Murugesan, O.Tangermann, M.Hartman //Chem. Mater. 2004. 16, 3056-3065.
8. I.A.Kirilyuk, A.A.Bobko, V.V.Khramtsov, I.A.Grigor'ev //Org. Biomol. Chem. 2005. 3, 1269-1274.
9. I.A.Kirilyuk, T.G.Shevelev, D.A.Morozov, E.L.Khromovskih, N.G.Skuridin, V.V.Khramtsov, I.A. Grigor'ev //Synthesis. 2003. 6, 871-878.
10. L.S.Molochnikov, E.G.Kovalyova, I.A.Grigor'ev, V.A.Reznikov /Metal-Containing Polymeric Materials. Ed. C.U.Pittman, et al. Plenum Press. N.Y. and London. 395-401.
11. Е.Г.Ковалева, Л.С.Молочников, И.Н.Липунов, В.В.Котов, О.В.Дьяконова // Межвузовский сборник «Теория и практика сорбционных процессов». 1998. Воронеж, ВГУ. В. 23. 81-88.
12. Л.С.Молочников, Е.Г.Ковалева, И.А.Григорьев //Межвузовский сборник «Теория и практика сорбционных процессов». 1999. Воронеж, ВГУ. В. 25. 131-141.
13. Budil D E., Sanghyuk L., Saxena S., Freed J. H. // J. Magn. Res. A. 1996. V.120. P.155.
14. G.Martini, M.F.Ottaviani, M.Romanelli //J. Colloid and Interface Science, 1983, 94, #1,105-113.
15. M.Romanelli, M.F.Ottaviani, G.Martini //J. Colloid and Interface Science, 1983, 96, #2, 373-380.
16. G.Martini //Colloids and Surfaces, 1984, 11, 409-421.
17. G.Martini, M.Bindi, M.F.Ottaviani, M.Romanelli //J. Colloid and Interface Science, 1985, 108, #1, 140-148.
18. Р.И.Самойлова, А.Д.Милов, Ю.Д.Цветков //Коллоидный журнал, 1989, 51, №4, 725-730.
19. П.П.Борбат, А.Д.Милов, Р.И.Самойлова, А.А.Сухорослов //Коллоидный журнал, 1990, 52, №2, 341-345.
20. Okazaki, M.; Toriyama, K. //J. Phys. Chem. B. 2003, 107, 7654.
21. Okazaki, M.; Toriyama, K. //J. Phys. Chem. B. 2005, 109, 13180.

22. Okazaki, M.; Toriyama, K. J. //Phys. Chem. B. 2007, 111, 9122.
23. Okazaki, M.; Anadan, S.; Seelan, S.; Nishida, M.; Toriyama, K. //Langmuir. 2007, 23, 1215.
24. Okazaki, M.; Toriyama, K. //J. Phys. Chem. B. Letters. 2005, 109, 20068.
25. Morishige, K.; Nobuoka, K. //J. Chem. Phys. 1997, 107, 6965.
26. E.G.Kovalyova, M.Hartman, E.L.Medyantseva, L.S.Molochnikov, C.Govindasamy, I.A. Grigor'ev /Book of abstracts 4-th International Conf. on Nitroxide Radicals "SPIN-2005". Novosibirsk, Russia. 2005. P.18.
27. Химия привитых поверхностных соединений. Под ред. Г.В.Лисичкина. М., Физматлит, 2003. 592 с.
28. Long, Y.; Xu, T.; Sun, Y.; Dong, W. //Langmuir. 1998, 14, 6173.
29. Zhao, X.S.; Lu,G.Q. //J. Phys. Chem B. 1998, 102, 1556.
30. Тихомолова К.П. Электроосмос; Химия: Ленинград, СССР, 1989.
31. Tamashiro, M.N.; Henriques, V.B.; Lamy, M.T. Langmuir. 2005, 21, 11005.
32. Hansen, E.W.; Stöcker, M.; Schmidt, R. J. Phys. Chem. 1996, 100, 2195.
33. Smirnov, P.; Yamaguchi, T.; Kittaka, S.; Takahara, S.; Kuroda, Y. //J. Phys. Chem. B. 2000, 104, 5498.
34. Дерягин, Б.В.; Чураев, Н.В.; Муллер, В.М. Поверхностные силы; Наука: Москва, СССР, 1985.
35. Takahara, S.; Sumiyama, N.; Kittaka, S.; Yamaguchi, T.; Bellissent-Funel, M-C. //J. Phys. Chem. B. 2005, 109, 11231.
36. Mchedlov-Petrosyan, N.O. //Kharkov University Bulletin. 2005, #648. Chemical Series, 12 (35), 27.
37. Fernandez, M.S.; Fromherz, P. //J. Phys. Chem. 1977, 81, 1755.
38. Fromherz, P. //Methods in enzymology. 1989, 171, 376.
39. Khrantsov, V.V.; March, D.; Weiner, L.M.; Reznikov, V.A. //Bioch. Bioph. Acta. 1992, 1104, 317.
40. Khrantsov, V.V.; Volodarsky, L.B. /In Biological Magnetic Resonance, V. 14: Spin Labeling: The Next Millennium; Berliner, L.J., Ed.; Plenum Press: New York, 1998, 109.
41. Griffith, O.H.; Dehlinger, P.J.; Van, S.P. //J. Membrane Biol. 1974, 15, 159.
42. Deere, J.; Magner, E.; Wall, J.G.; Holdnett, B.K. //J. Phys. Chem. B. 2002, 106, 7340.
43. Zhao, X.S.; Lu,G.Q.; Whittaker, A.K.; Millar, G.J.; Zhu, H.Y. J. Phys. Chem B. 1997, 101, 6525.
44. Méndez, A.; Bosch, E.; Rosés, M; Neue, U.D. //J. Chromatogr. A. 2003, 986, 33.

---

**Головкина Елена Леонидовна** – вед. инженер каф. общей и неорганической химии Уральского государственного лесотехнического университета, Екатеринбург, тел.: (922) 13-96-259

**Ковалева Елена Германовна** - доцент, к.х.н., каф. общей и неорганической химии, Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, тел.: (343) 262-97-86

**Молочников Леонид Самуилович** - проф., д.х.н., каф. общей и неорганической химии, Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, тел.: (343) 262-97-86

**Golovkina Elena L.** - engineer, Chair of the general and inorganic chemistry, Ural State Forest Engineering University, Ekaterinburg, tel.: (922) 13-96-259, e-mail: [golovkina\\_e.l@mail.ru](mailto:golovkina_e.l@mail.ru)

**Kovaleva Elena G.** - senior lecturer, Cand.Chem.Sci., Chair of the general and inorganic chemistry, Ural State Forest Engineering University, Ekaterinburg, tel.: (343) 262-97-86, e-mail: [gek@mail.ur.ru](mailto:gek@mail.ur.ru)

**Molochnikov: Leonid S.** - professor, Doctor of Chemistry, Chair of the general and inorganic chemistry, Ural State Forest Engineering University, Ekaterinburg, tel.: (343) 262-97-86, e-mail: [mls@mail.ur.ru](mailto:mls@mail.ur.ru)

---

**Hartmann Martin** - Universität Augsburg,  
Augsburg, Germany

**Govindasamy Ch** - Department of chemistry,  
Chemical technology, Technical University of  
Kaiserslautern, Kaiserslautern

**Григорьев Игорь Алексеевич** - проф., д.х.н.,  
директор, Новосибирский институт органической  
химии им. Н.Н.Ворожцова СО РАН, Новосибирск,  
тел.: (3833) 30-88-52

**Кирилюк Игорь Анатольевич** - вед. научн.  
сотр., к.х.н., и.о. зав. лабораторией,  
Новосибирский институт органической химии им.  
Н.Н.Ворожцова СО РАН, Новосибирск, тел.:  
(3833) 34-23-87

**Hartmann Martin** - Doctor of Chemistry  
Universität Augsburg, Augsburg, Germany

**Govindasamy Ch.** - Doctor of Chemistry  
Department of chemistry, Chemical technology,  
Technical University of Kaiserslautern,  
Kaiserslautern

**Grigor'ev Igor A.** - professor, Doctor of  
Chemistry, director, Vorozhtsov Novosibirsk Institute  
of Organic Chemistry, SB RAS, Novosibirsk, tel.:  
(3833) 30-88-52, e-mail: [grig@nioch.nsc.ru](mailto:grig@nioch.nsc.ru)

**Kirilyuk Igor A.** - scientific employee,  
Cand.Chem.Sci., Vorozhtsov Novosibirsk Institute of  
Organic Chemistry, SB RAS, Novosibirsk, tel.: (3833)  
34-23-87, e-mail: [kirilyuk@nioch.nsc.ru](mailto:kirilyuk@nioch.nsc.ru)



УДК 541.183

## Оценка гидратационной способности ионообменника АНКБ-35, насыщенного аминокислотными комплексами меди (II) и никеля (II)

Астапов А.В., Перегудов Ю.С., Давыдова Е.Г.

*Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж*

### Аннотация

Изопиестическим и ИК-спектроскопическим методами исследованы гидратационные характеристики хелатообразующего ионита АНКБ-35 в различных ионных формах. Показано наличие в ионообменнике энергетически неравноценных молекул растворителя. Вычислены значения энергии Гиббса гидратации ионита в  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ -формах, а также насыщенного аминокислотными комплексами меди (II) и никеля (II)

**Ключевые слова:** ионит, гидратация, комплексные ионы

Isopiestic and IR-spectroscopical methods investigate hydration characteristics of chelated ion exchanger АНКБ-35 in various ionic forms. Presence in an ion exchanger of energetically not interconvertible molecules of a dissolvent is shown. Values of energy of Gibbs of hydration of ion exchanger in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ -forms, and also saturated by aminoacidic complexes of copper (II) and nickel (II) are calculated.

**Key words:** Ion exchanger, hydration, complex ions

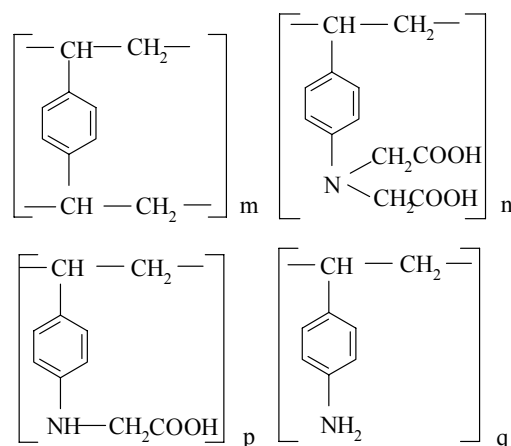
### Введение

В природе и в стоках пищевой и фармацевтической промышленности аминокислоты часто присутствуют в виде аминокислотных комплексов с ионами металлов. Возможность использования методов ионообменного разделения в сложных многокомпонентных системах, включающих ионы переходных металлов и физиологически активные вещества, определяется особенностями структуры и устойчивости соединений, образующихся в фазе ионообменника с учетом закономерностей гидратации ионов. Данные о состоянии воды в ионообменных материалах, а также взаимодействиях растворителя с функциональными группами ионообменника и противоионами являются основой для описания сорбционных процессов в системах «ионообменник – ион металла – аминокислота – вода». Применение метода изопиестирования позволило рассмотреть изменение гидратационных характеристик ионообменника в различной ионной форме, дать количественную оценку степени гидратации и определить количество энергетически неравноценных форм растворителя.

## Эксперимент

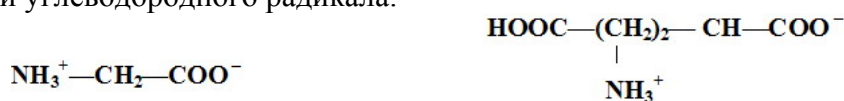
Целью данной работы являлось изучение гидратационной способности полиамфолита АНКБ-35 в форме аминокислотных комплексов ионов Cu(II) и Ni(II).

В работе использовали хелатообразующий аминокислотный амфолит АНКБ-35 (г. Кемерово, завод «Карболит») в натриевой форме. Структура элементарного звена ионита [1]:



Отношение концентрации карбоксильных групп к суммарной концентрации азота в ионите составляет 1,74 [2]. Влажность АНКБ-35 составила 7,3 %.

В качестве водорастворимых лигандов выбраны аминокислоты: глицин (Gly) и глутаминовая кислота (Glu), отличающиеся количеством карбоксильных групп и длиной углеводородного радикала.



Gly<sup>±</sup>

Glu<sup>±</sup>

В роли комплексообразователей выступали ионы Cu(II) и Ni(II), как наиболее часто применяемые в лигандообменной хроматографии [3]. Концентрацию ионов меди и никеля определяли йодометрическим и комплексонометрическим титрованием.

В предыдущих работах [4, 5] было установлено, что при взаимодействии АНКБ-35 с растворами комплексов  $[\text{CuGly}_2]$ ,  $[\text{NiGly}_2]$ ,  $[\text{CuGlu}_2]^{2-}$ ,  $[\text{NiGlu}_2]^{2-}$  происходит их частичное разрушение и ионообменник насыщается соответственно ионами  $[\text{CuGly}]^+$ ,  $[\text{NiGly}]^+$ ,  $[\text{CuGlu}]^\pm$ ,  $[\text{NiGlu}]^\pm$ .

Гидратационные характеристики полиамфолита АНКБ-35 в различных формах исследовали изопиестическим методом в интервале активности воды ( $a_w$ ) от 0,110 до 0,980 при  $298,0 \pm 1,0$  К. Образцы АНКБ-35, выдержанные над  $\text{CaCl}_2$ , а затем над  $\text{P}_2\text{O}_5$ , приводили в изопиестическое равновесие с насыщенными растворами солей:  $\text{LiCl}$   $a_w = 0,110$ ;  $\text{CaCl}_2 - 0,284$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 - 0,488$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 0,618$ ,  $\text{NaNO}_3 - 0,738$ ,  $\text{KBr} - 0,807$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 - 0,783$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 - 0,954$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - 0,980$ . Контроль над достижением равновесия и определение количества поглощенной воды осуществляли методом гравиметрии. Критерием достижения равновесия служило установление постоянной массы образца.

Для получения информации о состоянии воды в ионообменнике использовали метод ИК-спектроскопии. ИК-спектры снимали на приборе «Spekord IR-75». Интерпретацию спектров осуществляли, используя данные работ [6-9].



## Результаты и обсуждение

Изотермы сорбции паров воды ионообменником в различных формах, служащие количественной мерой поглощения растворителя представлены на рис. 1.

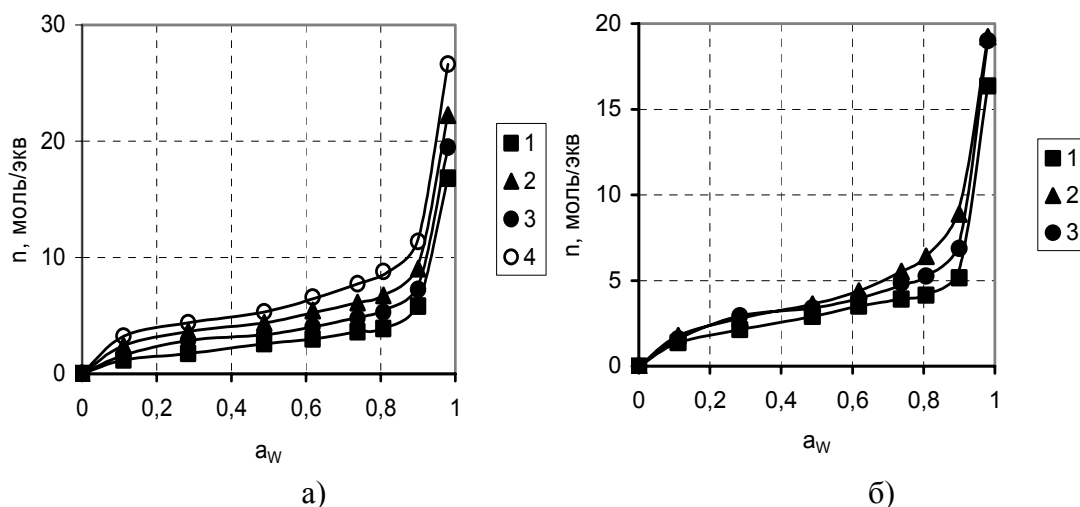


Рис. 1. Изотермы сорбции паров воды различными формами ионита АНКБ-35 при 298 К  
а) 1 –  $\text{Cu}^{2+}$ , 2 –  $[\text{CuGly}]^+$ , 3 –  $[\text{CuGlu}]^\pm$ , 4 –  $\text{Na}^+$ ; б) 1 –  $\text{Ni}^{2+}$ , 2 –  $[\text{NiGly}]^+$ , 3 –  $[\text{NiGlu}]^\pm$

S - образная форма кривых, характерная для изотерм, описывающих полимолекулярную адсорбцию, предполагает различный характер поглощения паров воды на каждом участке [10]. В первую очередь, происходит гидратация наиболее активных групп с образованием монослоя адсорбированных молекул воды. Затем за счет связывания воды менее активными центрами образуются несколько последующих слоев. По окончании процесса водяных паров ионообменником осмотическое поглощение воды приводит к набуханию.

Согласно полученным данным, присутствие никеля, меди и аминокислотных комплексов в ионообменнике уменьшает величину влагопоглощения во всем интервале активности растворителя по сравнению с натриевой формой. По содержанию общего количества воды различные формы ионообменника можно расположить в следующий ряд:



Сорбционное отношение  $n/n_A$  (где  $n$  и  $n_A$  – соответственно количество поглощенных молекул воды ионообменником в  $\text{Na}^+$ -форме и содержащим ионы никеля, меди или аминокислотные комплексы металлов) в ряду изменяется при  $a_w=0,110$  в 2,0 – 2,5 раза, при  $a_w=0,980$  в 1,4 – 1,6 раза. Наибольшего значения величина  $n/n_A$  достигает в случае ионообменника, насыщенного ионами металлов. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в области низкой активности воды, ионообменник, насыщенный исследуемыми ионами, поглощает молекулы воды менее интенсивно по сравнению с натриевой формой. Увеличение количества сорбированных аминокислотных комплексных ионов и катионов металлов, возможно, приводит к повышению степени дегидратации сорбента, что равносильно эффекту, вызываемому увеличением сетчатости. Большее количество сорбированной воды в случае аминокислотных комплексных ионов по сравнению с ионами переходных металлов, вероятно, обусловлено тем, что активные группы

аминокислот участвуют в образовании дополнительных водородных связей с молекулами воды.

На основании данных по изотермам сорбции молекул воды рассчитаны значения свободной энергии гидратации  $\Delta G_{\text{гидр}}$  по формуле [11]:

$$\Delta G_{\text{гидр}} = nRT \ln a_w - RT \int_0^{a_w} n \, d \ln a_w$$

где  $n$  - количество моль воды на эквивалент фиксированных групп.

Согласно полученным экспериментальным данным, величина  $\Delta G_{\text{гидр}}$  отрицательна и существенно изменяется при увеличении содержания воды в ионообменнике. Наибольшие изменения  $\Delta G_{\text{гидр}}$  для  $\text{Na}^+$ -формы наблюдаются при сорбции до 4,6 моль,  $[\text{CuGly}]^+$  до 3,7, для  $[\text{NiGly}]^+$  до 3,0, для  $[\text{NiGlu}]^\pm$ ,  $[\text{CuGlu}]^\pm$  до 2,9 моль, для  $\text{Ni}^{2+}$  до 2,1, а для  $\text{Cu}^{2+}$  до 1,8 моль воды на моль функциональных групп (рис. 2), когда взаимодействие вода - активные центры наиболее интенсивно. Дальнейшее поглощение воды волокном сопровождается незначительным изменением величины  $\Delta G_{\text{гидр}}$ , что выражается в плавном изменении величин  $\Delta G_{\text{гидр}}$ .

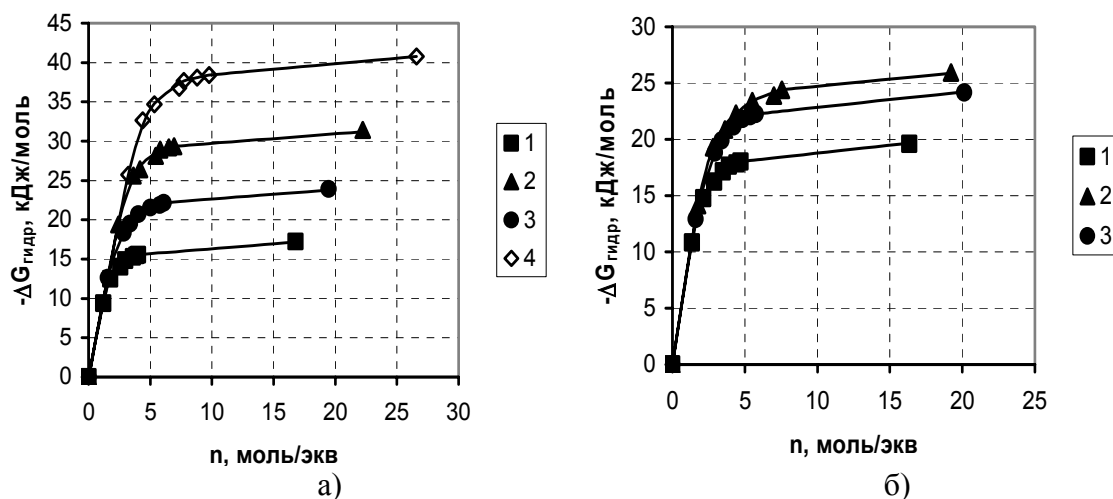


Рис. 2.  $\Delta G$  гидратации различных форм ионита АНКБ-35 при 298 К  
а) 1 –  $\text{Cu}^{2+}$ , 2 –  $[\text{CuGly}]^+$ , 3 –  $[\text{CuGlu}]^\pm$ , 4 –  $\text{Na}^+$ ; б) 1 –  $\text{Ni}^{2+}$ , 2 –  $[\text{NiGly}]^+$ , 3 –  $[\text{NiGlu}]^\pm$

На рис. 3 представлены ИК-спектры различных форм ионообменника в области  $3700 - 2500 \text{ см}^{-1}$ . Большое количество абсорбционных полос в ИК-спектрах АНКБ-35 в области  $3700-3200 \text{ см}^{-1}$ , вероятно, вызвано тем, что функциональные группы ионита и аминокислот при гидратации образуют ассоциаты с водой различной степени прочности.

Уменьшение интенсивности полос поглощения в интервале  $3695 - 3680 \text{ см}^{-1}$  на спектрах АНКБ-35, насыщенного ионами металлов и комплексными ионами по сравнению с натриевой формой, указывает на снижение количества «свободной» воды, что связано с дегидратацией ионообменника в процессе сорбции. Содержание слабосвязанной воды уменьшается в ряду, аналогичному приведенному выше.

В спектрах АНКБ-35 наблюдаются полосы, отвечающие колебаниям молекул воды, связанных с функциональными группами ионита и аминокислот. В области  $3200-3120$  и  $3100-3046 \text{ см}^{-1}$  присутствуют максимумы, характеризующие колебания связей  $\text{H}_2\text{O} \dots \text{COO}^-$  и  $\text{H}_2\text{O} \dots ^+\text{NH}_3$  соответственно. Меньшая интенсивность полос наблюдается для ионообменника, насыщенного ионами  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ .

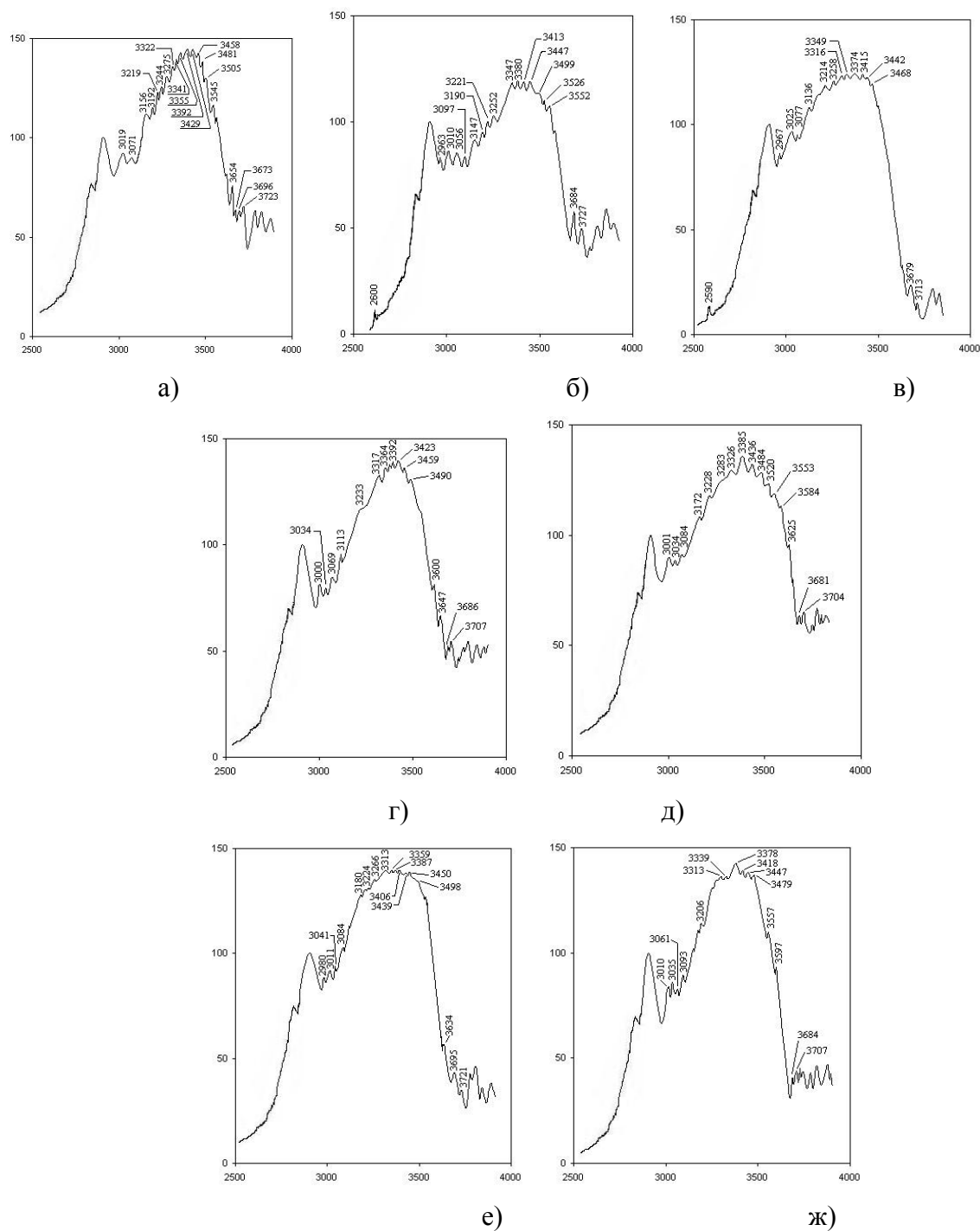


Рис. 3. ИК-спектры различных форм ионита АНКБ-35 (область 2500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ )

а) –  $\text{Na}^+$ , б) –  $\text{Cu}^{2+}$ , в) –  $\text{Ni}^{2+}$ , г) –  $[\text{CuGly}]^+$ , д) –  $[\text{CuGlu}]^\pm$ ,  
 е) –  $[\text{NiGly}]^+$ , ж) –  $[\text{NiGlu}]^\pm$

По смещению частоты колебаний ОН-групп воды различной степени связанности был рассчитан ряд энергетических характеристик, описывающих гидратацию (табл. 1) [12].

Таблица 1. Параметры водородных связей для различных форм ионита АНКБ-35

| Область спектра         | Ионные формы    | $\nu_{OH}$ , $cm^{-1}$ | $\Delta\nu$ , $cm^{-1}$ | $E_n$ , $\frac{kJ}{mole}$ | $-\Delta H$ , $\frac{kJ}{mole}$ | $K_n \cdot 10^5$ , $cm^{-1}$ | $K_{OH} \cdot 10^6$ , $cm^{-1}$ | $R_{O-O}$ , А | $R_{O-N}$ , А | $\Delta G_n$ , А |
|-------------------------|-----------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|------------------|
| Слабо-связанная вода    | $Na^+$          | 3696                   | 4                       | 0,283                     | 2,680                           | 0,037                        | 12,847                          | 2,839         | 3,113         | 0                |
|                         | $Cu^{2+}$       | 3680                   | 20                      | 1,414                     | 5,992                           | 0,186                        | 12,719                          | 2,835         | 3,084         | 0,001            |
|                         | $Ni^{2+}$       | 3680                   | 20                      | 1,414                     | 5,992                           | 0,186                        | 12,719                          | 2,835         | 3,084         | 0,001            |
|                         | $[CuGly]^+$     | 3686                   | 14                      | 0,990                     | 5,013                           | 0,130                        | 12,767                          | 2,837         | 3,094         | 0,001            |
|                         | $[NiGly]^+$     | 3685                   | 15                      | 1,061                     | 5,189                           | 0,139                        | 12,759                          | 2,837         | 3,093         | 0,001            |
|                         | $[CuClu]^{\pm}$ | 3681                   | 19                      | 1,344                     | 5,840                           | 0,177                        | 12,727                          | 2,836         | 3,085         | 0,001            |
|                         | $[NiClu]^{\pm}$ | 3684                   | 16                      | 1,132                     | 5,359                           | 0,149                        | 12,751                          | 2,836         | 3,081         | 0,001            |
| Ассоциаты вода – вода   | $Na^+$          | 3441                   | 259                     | 18,317                    | 21,562                          | 2,406                        | 10,802                          | 2,781         | 2,647         | 0,014            |
|                         | $Cu^{2+}$       | 3413                   | 287                     | 20,297                    | 22,697                          | 2,666                        | 10,578                          | 2,775         | 2,596         | 0,015            |
|                         | $Ni^{2+}$       | 3415                   | 285                     | 20,156                    | 22,618                          | 2,648                        | 10,594                          | 2,775         | 2,600         | 0,015            |
|                         | $[CuGly]^+$     | 3423                   | 277                     | 19,590                    | 22,298                          | 2,573                        | 10,658                          | 2,777         | 2,615         | 0,015            |
|                         | $[NiGly]^+$     | 3439                   | 261                     | 18,459                    | 21,645                          | 2,425                        | 10,786                          | 2,781         | 2,644         | 0,014            |
|                         | $[CuClu]^{\pm}$ | 3436                   | 264                     | 18,671                    | 21,769                          | 2,453                        | 10,762                          | 2,780         | 2,638         | 0,014            |
|                         | $[NiClu]^{\pm}$ | 3418                   | 282                     | 19,944                    | 22,499                          | 2,620                        | 10,618                          | 2,776         | 2,605         | 0,015            |
| Вода – амино-группа     | $Na^+$          | 3392                   | 308                     | 21,783                    | 23,513                          | 2,861                        | 10,410                          | 2,770         | 2,558         | 0,016            |
|                         | $Cu^{2+}$       | 3375                   | 325                     | 22,985                    | 24,153                          | 3,019                        | 10,273                          | 2,766         | 2,527         | 0,017            |
|                         | $Ni^{2+}$       | 3374                   | 326                     | 23,056                    | 24,190                          | 3,029                        | 10,265                          | 2,766         | 2,525         | 0,017            |
|                         | $[CuGly]^+$     | 3392                   | 308                     | 21,783                    | 23,513                          | 2,861                        | 10,410                          | 2,770         | 2,558         | 0,016            |
|                         | $[NiGly]^+$     | 3387                   | 313                     | 22,136                    | 23,703                          | 2,908                        | 10,369                          | 2,769         | 2,549         | 0,017            |
|                         | $[CuClu]^{\pm}$ | 3385                   | 315                     | 22,278                    | 23,779                          | 2,927                        | 10,353                          | 2,768         | 2,545         | 0,017            |
|                         | $[NiClu]^{\pm}$ | 3378                   | 322                     | 22,773                    | 24,041                          | 2,992                        | 10,297                          | 2,767         | 2,532         | 0,017            |
| Вода – группа $COO^-$   | $Na^+$          | 3219                   | 481                     | 34,018                    | 29,384                          | 4,469                        | 9,022                           | 2,731         | 2,242         | 0,025            |
|                         | $Cu^{2+}$       | 3147                   | 553                     | 39,110                    | 31,506                          | 5,138                        | 8,445                           | 2,714         | 2,111         | 0,029            |
|                         | $Ni^{2+}$       | 3136                   | 564                     | 39,888                    | 31,818                          | 5,240                        | 8,357                           | 2,712         | 2,091         | 0,030            |
|                         | $[CuGly]^+$     | 3215                   | 485                     | 34,301                    | 29,506                          | 4,506                        | 8,990                           | 2,730         | 2,235         | 0,026            |
|                         | $[NiGly]^+$     | 3180                   | 520                     | 36,776                    | 30,552                          | 4,831                        | 8,710                           | 2,722         | 2,171         | 0,028            |
|                         | $[CuClu]^{\pm}$ | 3172                   | 528                     | 37,342                    | 30,786                          | 4,905                        | 8,646                           | 2,720         | 2,156         | 0,028            |
|                         | $[NiClu]^{\pm}$ | 3206                   | 494                     | 34,937                    | 29,778                          | 4,590                        | 8,918                           | 2,728         | 2,219         | 0,026            |
| Вода кристалло-гидратов | $Cu^{2+}$       | 2600                   | 1100                    | 77,795                    | 44,435                          | 10,220                       | 4,059                           | 2,590         | 1,113         | 0,058            |
|                         | $Ni^{2+}$       | 2590                   | 1110                    | 78,503                    | 44,637                          | 10,313                       | 3,979                           | 2,588         | 1,094         | 0,059            |

Полученные значения позволяют судить о прочности водородной связи. Уменьшение энергии  $E_n$  с одновременным увеличением интенсивности полос, характеризующих колебания ассоциированных ОН-групп, может быть вызвано ростом числа молекул с ослабленными водородными связями, вследствие увеличения степени гидратации [13]. В интервалах частот, отвечающих ассоциатам вода – вода, вода – аминогруппа и вода – ионизированная карбоксильная группа минимальное смещение частоты валентных колебаний характерно для  $Na^+$ -формы ионита. Максимальная энергия водородной связи наблюдается для медной и никелевой форм ионита. Для этих форм также характерной особенностью является наличие пиков поглощения вблизи  $2600\text{ см}^{-1}$ , которые могут быть отнесены к колебаниям ОН-групп воды, координированной ионом металла, характеризующихся наибольшей энергией водородной связи.

## Заключение

Таким образом, молекулы воды участвуют в образовании водородных связей с функциональными группами ионита и аминокислот, а также координируются

ионами металлов. Различные формы ионообменника по содержанию гидратной воды, можно расположить в ряд:



Наибольшее содержание воды характерно для натриевой формы ионообменника, что, вероятно, обусловлено максимально возможным содержанием осмотически активных частиц в ионообменнике. Низкие величины гидратации медной и никелевой форм ионообменника, вероятно, обусловлены возможностью дополнительной сшивки с участием этих ионов, то есть сжатием полимерной матрицы, что вызывает помимо дегидратации функциональных групп, вытеснение значительного количества «свободной» воды. Поглощение комплексных ионов вызывает не столь сильное снижение гидратации, поскольку они взаимодействуют лишь с частью иминодиуксусной группы ионита. То есть они, во-первых, не «сшивают» ионит, а во-вторых, не так сильно уменьшают количество осмотически активных частиц в ионите по сравнению с ионами меди и никеля.

### Список литературы

1. Практикум по ионному обмену / Селеменев В.Ф., Славинская Г.В., Хохлов В.Ю., Чикин Г.А. -Воронеж: ВГУ, 1999. -173 с.
2. Шкутина И.В. Параметры протолиза аминокислотных полиэлектролитов // Химия: Теория и технология. -Воронеж: ВГУ, 1999. -Вып. 1. -С. 125.
3. Даванков В.А. Лигандообменная хроматография / В.А.Даванков, Дж. Навратил, Х. Уолтон. -М.: Мир, 1989. -294 с.
4. Астапов А.В. Комплексообразование анионов глицина и глутаминовой кислоты с ионами Cu(II) и Ni(II) на полиамфолите АНКБ-35: Дис. ... канд. хим. наук. - Воронеж.: ВГУ, 2004. -137 с.
5. Амелин А.Н., Астапов А.В., Перегудов Ю.С., Амелина Ж.С. Комплексообразование и ионный обмен в системе глицин – ион меди (II) – ионит АНКБ-35 при различных температурах // Вестник ВГТА. –Воронеж, 2004. № 9. С. 71-76.
6. Г. Цундель. Гидратация и межмолекулярное взаимодействие. /Пер. с англ. Ше Мидона: Под ред. Ю.Н. Чиргадзе. –М.: Мир. –1972. –406 с.
7. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. -М.: Иностран. лит., 1963. - 590 с.
8. Накамото К. Инфракрасные спектры неорганических и координационных соединений. -М.: Мир, 1966. -412 с.
9. Литтл Л. Инфракрасные спектры адсорбированных молекул. /Пер. с англ. А.А. Слинкина, В.И. Якесона, Т.И. Титовой: Под ред. В.И. Лыгина. –М.: Мир, 1969. –514 с.
10. Михеев Ю.А., Заиков Г.Е. Адсорбция и сольватация воды полимерами // Российский хим. журнал. 1999. Т.63, N2. С.67-73.
11. Полянский Н.Г., Горбунов Г.В., Полянская Н.Я. Методы исследования ионитов. - М.: Химия, 1976. -280 с.
12. Селеменев В.Ф. Обменные процессы и межмолекулярные взаимодействия в системе ионит – вода – аминокислота: Дисс. ... докт. хим. наук. –Воронеж: ВГУ, 1993. –621 с.
13. Уэндланд У. Термические методы анализа / Пер. с англ. под ред. В.А. Степанова, В.А. Берштейна. –М.: Мир, 1978. –326 с.

---

**Астапов Алексей Владимирович** – к.х.н., доцент кафедры общей и неорганической химии Воронежской государственной технологической академии

**Перегудов Юрий Семенович** - к.х.н., доцент кафедры общей и неорганической химии Воронежской государственной технологической академии

**Давыдова Екатерина Геннадьевна** - к.х.н., ассистент кафедры общей и неорганической химии Воронежской государственной технологической академии

**Astapov Aleksey V.** – senior lecturer of General and Inorganic Chemistry Department, Voronezh State Technological Academy; tel. (4732) 55-38-87, e-mail: [inorganic\\_033@mail.ru](mailto:inorganic_033@mail.ru)

**Peregudov Yuriy S.** – senior lecturer of General and Inorganic Chemistry Department, Voronezh State Technological Academy; tel. (4732) 55-38-87, e-mail: [inorganic\\_033@mail.ru](mailto:inorganic_033@mail.ru)

**Davydova Ekaterina G.** – assistant of General and Inorganic Chemistry Department, Voronezh State Technological Academy; tel. (4732) 55-38-87, e-mail: [inorganic\\_033@mail.ru](mailto:inorganic_033@mail.ru)



УДК 544.182.32:547.466:54.126

## Моделирование структуры и стабильности комплексов глицина с полимером на основе полиамидокислоты

Зяблов А.Н., Мишина А.А., Жиброва Ю.А., Селеменев В.Ф.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

### Аннотация

С помощью пакета программ Gaussian 03 методом теории функционала плотности B3LYP/6-31G проведены расчеты комплексов глицин-полиамидная кислота с различным числом составного повторяющегося звена (от 1 до 3). Полученные данные использованы для качественного объяснения процессов, происходящих на границе полимер – глицин при синтезе полимеров с молекулярными отпечатками аминокислоты. Установлено, что с увеличением числа элементарных звеньев в полимере стабильность комплекса увеличивается. Молекула глицина оказывает координирующее действие на внутримолекулярную структуру полимера.

**Ключевые слова:** полимеры с молекулярными отпечатками, структура, водородная связь, B3LYP.

Calculations of the complexes glycine-polyamidoacid with different number of the elementary part (from 1 to 3) has been performed using Gaussian 03 at B3LYP/6-31G level. The results were applied for quality explanations of processes taking place on the surface of polymer in synthesis of molecular imprinted polymer. It has been suggested that stability complexes were increased according to grow number of elementary part poliamidoacid. The molecule glycine has influenced on the intermolecular bonding in the polymer.

**Keywords:** Molecular Imprinted Polymer, Structure, Hydrogen Bond, B3LYP.

### Введение

Синтез полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) в настоящее время является одним из перспективных направлений. Это связано с рядом достоинств, которыми они обладают: крайне высокая стабильность, простота получения, сопоставимые с природными рецепторами аффинность и селективность.

Полимеры с молекулярными отпечатками имеют в своей структуре трехмерные полости структурно комплементарные молекулам вещества, которые использовались в качестве шаблона (темплата) и добавлялись при синтезе полимера. Селективность взаимодействия ПМО – темплат очень высока, при использовании ПМО можно разделять энантиомеры и определять количественный состав их смесей [1]. Особую актуальность в аналитической практике приобрел анализ растворов физиологически активных веществ с помощью сенсоров, модифицированных полимером с молекулярным отпечатком.

Поэтому одной из важных задач синтеза импринтированных полимеров является изучение процессов, происходящих на границе полимер – темплат. В

настоящее время нет экспериментальных или теоретических методов оценки зарядов атомов на поверхности полимера, поэтому целью данной работы является квантовохимический расчет стабильности, электронной структуры системы полиамидокислота – глицин, что необходимо для понимания и объяснения процессов взаимодействия между полимером и аминокислотой.

## Эксперимент

Вычисления были выполнены, используя метод теории функционала плотности (DFT) в программе Gaussian 03 [2]. Геометрии основного составного повторяющегося звена полиамидокислота (ПАК), ее димера и тримера, а также молекулы глицина и комплексов аминокислота – ПАК были оптимизированы на уровне B3LYP, используя базисный набор 6-31G (рис.1).

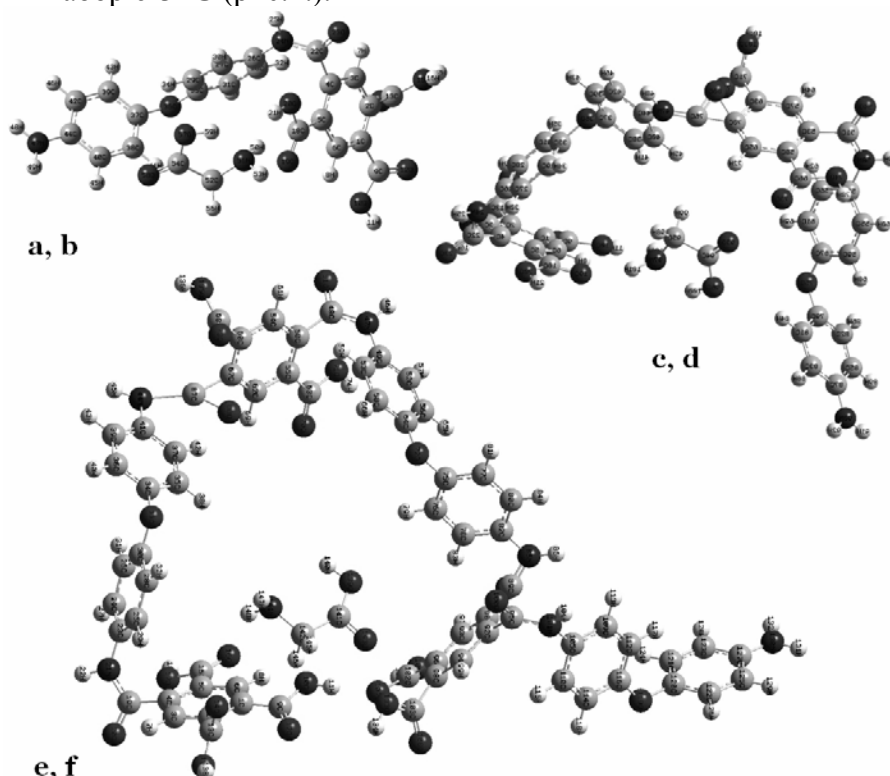


Рис.1. Оптимизированные структуры составного повторяющегося звена мономер (a) – без глицина, (b) - с глицином; димер (c) – без глицина, (d) - с глицином; тример (e) – без глицина; (f) – с глицином

Учет ошибки базисного набора (BSSE) был выполнен, используя метод теории функционала плотности на уровне B3LYP/6-31G и B3LYP/6-311G. Все атомы рассматривались, как точечные заряды. Сначала рассчитывали энергию составных частей полиамидокислота в поле зарядов атомов аминокислоты, затем энергию аминокислоты при воздействии на нее поля, создаваемого зарядами атомов выбранных фрагментов полиамидокислота. Рассчитанные таким образом энергии составных частей системы сравнивали с энергиями комплексов [3].



## Обсуждение результатов

Метод теории функционала плотности имеет сравнительно небольшие ограничения и достаточно широко применяется для квантовохимических расчетов сложных систем [4, 5]. В частности, он может быть использован для описания систем с большим числом атомов, таких как полимерные структуры, где наблюдаются коллективные взаимодействия [6, 7].

Конфигурацию и стабильность изучаемых структур оценивали с помощью рассчитанных энергий взаимодействия, которые представлены в таблице 1. Установлено, что энергии связывания всех комплексов с глицином в 1.5 раза меньше, чем энергии оптимизированных составных частей полиамидной кислоты это указывает на образование водородных связей между глицином и полиамидной кислотой. В тоже время наблюдается закономерное увеличение стабильности комплексов полиамидной кислоты примерно в 2 раза в ряду: мономер, димер, тример, вследствие образования межмолекулярных связей. Достаточно большое различие в энергиях комплексов ПАК – аминокислота по сравнению изолированными составными частями ПАК может быть также объяснено электроно-донорной активностью аминогруппы и смещением электронной плотности к карбоксильным группам ПАК. Рассчитанная ошибка базисного набора не превышает 10 кДж/моль, что является приемлимой величиной для квантово-химических расчетов [3]. Уменьшение исправленной энергии взаимодействия комплекса тримера ПАК – глицин по всей видимости обусловлено образованием внутримолекулярных водородных связей, что повышает устойчивость конформации полимера и комплекса, а также свидетельствует о заметном вкладе стерического эффекта.

Таблица 1. Энергия взаимодействия ( $-\Delta E$  кДж/моль) комплексов полиамидной кислоты с глицином

| Метод             | b       | c       | d       | e       | f       |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| V3LYP/6-31G       | 153.899 | 146.214 | 300.114 | 297.455 | 446.384 |
| BSSE исправленная | 153.899 | 138.529 | 300.112 | 287.111 | 449.098 |

В таблице 2 представлены геометрические параметры оптимизированных комплексов а – f. Рассчитанные структурные параметры для комплексов ПАК – аминокислота в сравнении с изолированными частями ПАК позволяют сделать вывод, что геометрия остова комплекса не изменяется, и длины связей остаются постоянными ( $C_{22} - N_{24}$ ,  $C_{13} - N_{15}$ ,  $C_{44} - N_{47}$ ,  $C_{76} - N_{47}$ ,  $N_{85} - C_{89}$  и др.). Рассчитанные таким образом структурные характеристики хорошо коррелируют с экспериментальными [8]. Также по структурным данным можно сказать, что молекула аминокислоты в каждом комплексе образует водородные связи с карбонильной группой ПАК, что подтверждается небольшими расстояниями между атомами водорода аминогруппы глицина и кислородом карбоксильной группы полимера (0.2714 – 0.2996 нм).

Для комплекса тримера ПАК с глицином еще наблюдаются небольшие уменьшения связей  $H_{11} - O_{133}$  и  $O_{12} - H_{134}$ , что связано с координирующим действием аминокислоты на внутримолекулярные водородные связи. При этом глицин тоже образует водородные связи с кислородом карбоксильной группы полимера (0.2248 нм, 0.2440 нм). В тоже время расстояние между  $O_{143} - O_{133}$  достаточно маленькое (0.2539 нм), что приводит к электростатическому взаимодействию между карбонильными группами аминокислоты и полимера, создавая напряженную структуру, которая стабилизируется за счет внутримолекулярных взаимодействий.

Таблица 2. Геометрические параметры в оптимизированных структурах

| Функцион. группы                 | Длины связей, Å |       | Функцион. группы                  | Длины связей, Å |       | Функцион. группы                   | Длины связей, Å |       |
|----------------------------------|-----------------|-------|-----------------------------------|-----------------|-------|------------------------------------|-----------------|-------|
|                                  | a               | b     |                                   | c               | d     |                                    | e               | f     |
| C <sub>22</sub> -N <sub>24</sub> | 1.372           | 1.372 | N <sub>24</sub> -C <sub>22</sub>  | 1.372           | 1.372 | C <sub>19</sub> -N <sub>21</sub>   | 1.372           | 1.372 |
| C <sub>13</sub> -N <sub>15</sub> | 1.364           | 1.364 | C <sub>76</sub> -N <sub>47</sub>  | 1.310           | 1.310 | N <sub>44</sub> -C <sub>87</sub>   | 1.880           | 1.880 |
| C <sub>44</sub> -N <sub>47</sub> | 1.385           | 1.385 | C <sub>70</sub> -O <sub>80</sub>  | 1.442           | 1.442 | C <sub>48</sub> -N <sub>47</sub>   | 1.372           | 1.372 |
| H <sub>50</sub> -O <sub>19</sub> | –               | 2.760 | N <sub>50</sub> -C <sub>51</sub>  | 1.372           | 1.372 | N <sub>85</sub> -C <sub>89</sub>   | 1.230           | 1.230 |
| H <sub>50</sub> -O <sub>20</sub> | –               | 2.714 | H <sub>101</sub> -O <sub>19</sub> | –               | 2.470 | C <sub>95</sub> -N <sub>101</sub>  | 1.372           | 1.372 |
| N <sub>51</sub> -O <sub>19</sub> | –               | 3.582 | O <sub>93</sub> -O <sub>73</sub>  | –               | 5.939 | H <sub>11</sub> -O <sub>133</sub>  | 3.545           | 3.451 |
| H <sub>53</sub> -O <sub>19</sub> | –               | 3.955 | N <sub>97</sub> -O <sub>19</sub>  | –               | 3.136 | O <sub>12</sub> -H <sub>134</sub>  | 3.650           | 3.567 |
|                                  |                 |       | H <sub>100</sub> -O <sub>19</sub> | –               | 2.996 | H <sub>145</sub> -O <sub>10</sub>  | –               | 2.248 |
|                                  |                 |       |                                   |                 |       | N <sub>144</sub> -O <sub>16</sub>  | –               | 2.240 |
|                                  |                 |       |                                   |                 |       | H <sub>148</sub> -O <sub>16</sub>  | –               | 3.085 |
|                                  |                 |       |                                   |                 |       | O <sub>143</sub> -O <sub>133</sub> | –               | 2.539 |

Детальное изучение электронной структуры комплексов глицина с полиаминокислотой проводили сравнительным анализом зарядов и молекулярных орбиталей атомов исследуемых систем.

Энергия высшей заполненной молекулярной орбитали (ВЗМО) и низшей вакантной молекулярной орбитали (НВМО) в мономере соответственно 2.01 и 0.85 эВ и энергетический барьер составляет 1.16 эВ. В комплексе с глицином эти величины равны соответственно 1.98 и 0.95 эВ и энергетический барьер составляет 1.03 эВ, что немного отличается от мономера. Это свидетельствует о том, что водородные связи между молекулами изменяют электронные свойства комплекса и увеличивают значение энергии ВЗМО. Разница в энергиях ВЗМО и НВМО повышается от комплекса мономера ПАК с аминокислотой к комплексу тримера, что указывает на существенное электронодонорное влияние аминогруппы глицина на энергетический барьер. В тоже время наблюдается снижение энергетического барьера в ряду мономер – димер – тример. Это указывает на более глубокое перераспределение электронной плотности при образовании полимера.

Чтобы оценить вклад атомных орбиталей каждого атома в общую электронную структуру системы были рассчитаны заряды Милликена (таблица 3).

Заряды Милликена изолированных частей полимера равны 0.0002. Это указывает на то, что электроны почти не переносятся между элементарными звеньями при образовании димера и тримера полиамидной кислоты. Для комплексов глицина с полимером заряды Милликена равны –0.00004, –0.00005, –0.00008 для b, d, f соответственно. Это обнаруживает влияние аминокислоты на перенос заряда в комплексе. Заряды атомов кислорода карбоксильных групп аминокислоты O<sub>93</sub>, O<sub>143</sub> и полимера O<sub>19</sub>, O<sub>73</sub>, O<sub>133</sub>, в комплексах имеют приблизительно одинаковые значения – 0.5884, а заряды атомов водорода H<sub>21</sub>, H<sub>53</sub>, H<sub>50</sub>, H<sub>100</sub>, H<sub>101</sub>, H<sub>148</sub> – для глицина и H<sub>21</sub>, H<sub>11</sub> – для полиаминокислоты имеют значения более 0.3542, что свидетельствует о наличии водородной связи между этими атомами. Следует отметить, что в комплексе мономера ПАК с аминокислотой в водородных связях участвуют не только атомы водорода аминогруппы, но и азот N<sub>51</sub> с H<sub>21</sub> карбоксильной группы ПАК, на этот факт также указывает увеличение заряда H<sub>21</sub> с 0.3552 до 0.4020 в комплексе. Во всех комплексах атом азота глицина имеет сравнимый заряд (–0.7256), однако из-за пространственных характеристик возможна связь только для комплекса мономер – глицин (N<sub>51</sub> – H<sub>21</sub> 2.782 нм). Заряды атомов полимера, непосредственно не взаимодействующих с глицином мало изменяют свое значение при образовании комплекса, что свидетельствует о

незначительном перераспределении электронной плотности внутри полимера. Однако наблюдается увеличение поляризации связей при переходе от мономера к тримеру, что также указывает на значительное электронное перераспределение при образовании полимера.

Таблица 3. Заряды Милликена для оптимизированных структур

| атом            | 1       | 2       | атом             | 3       | 4       | атом             | 5       | 6       |
|-----------------|---------|---------|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|
| C <sub>22</sub> | 0.4487  | 0.4447  | C <sub>22</sub>  | 0.4485  | 0.4471  | C <sub>19</sub>  | 0.7999  | 0,8121  |
| C <sub>13</sub> | 0.4637  | 0.4649  | C <sub>76</sub>  | 0.3531  | 0.3486  | N <sub>44</sub>  | -0.9872 | -0.9845 |
| C <sub>44</sub> | 0.3431  | 0.3440  | C <sub>70</sub>  | 0.2457  | 0.2478  | C <sub>48</sub>  | 0.1912  | 0.1922  |
| H <sub>50</sub> | 0.3161  | 0.2979  | N <sub>50</sub>  | -0.7170 | -0.7166 | N <sub>85</sub>  | -0.7949 | -0.7834 |
| N <sub>15</sub> | -0.7038 | -0.7031 | C <sub>51</sub>  | 0.4432  | 0.4420  | C <sub>95</sub>  | 0.3982  | 0.4012  |
| O <sub>19</sub> | -0.4020 | -0.4103 | O <sub>73</sub>  | -0.4151 | -0.4149 | O <sub>16</sub>  | -0.5844 | -0.5946 |
| N <sub>24</sub> | -0.7158 | -0.7148 | O <sub>19</sub>  | -0.3997 | -0.4235 | O <sub>10</sub>  | -0.7455 | -0.8464 |
| O <sub>20</sub> | -0.5635 | -0.5616 | N <sub>24</sub>  | -0.7155 | -0.7148 | C <sub>89</sub>  | 0.2691  | 0.2697  |
| N <sub>47</sub> | -0.8182 | -0.8161 | N <sub>47</sub>  | -0.7297 | -0.7276 | N <sub>101</sub> | -0.9908 | -0.9745 |
| N <sub>51</sub> |         | -0.7659 | O <sub>80</sub>  | -0.3579 | -0.3594 | N <sub>21</sub>  | -0.9850 | -0.9645 |
| H <sub>53</sub> |         | 0.3221  | O <sub>93</sub>  |         | -0.5472 | C <sub>87</sub>  | 0.1844  | 0.1846  |
|                 |         |         | N <sub>97</sub>  |         | -0.7501 | N <sub>47</sub>  | -0.6790 | -0.6792 |
|                 |         |         | H <sub>100</sub> |         | 0.1792  | O <sub>12</sub>  | -0.5477 | -0.6012 |
|                 |         |         | H <sub>101</sub> |         | 0.1898  | H <sub>11</sub>  | 0.4544  | 0.4320  |
|                 |         |         |                  |         |         | H <sub>134</sub> | 0.2288  | 0.3542  |
|                 |         |         |                  |         |         | H <sub>145</sub> |         | 0.1895  |
|                 |         |         |                  |         |         | N <sub>144</sub> |         | -0.7294 |
|                 |         |         |                  |         |         | H <sub>148</sub> |         | 0.4210  |
|                 |         |         |                  |         |         | O <sub>133</sub> |         | -0.5478 |
|                 |         |         |                  |         |         | O <sub>143</sub> |         | -0.6789 |

Таким образом, были изучены комплексы глицин – полимер на основе полиаминокислоты в сравнении с изолированными частями полимера. Установлено, что молекула аминокислоты существенно влияет на электронную структуру комплексов, в то время как пространственная структура почти не изменяется. Показано, что полимер взаимодействует с глицином за счет образования водородных связей, существенно понижающих общую энергию систем. Таким образом, молекула аминокислоты, выступающая в роли темплата, изменяет свойства полимера, использованного для синтеза молекулярных отпечатков.

### Список литературы

1. Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А. Материалы с молекулярными отпечатками: синтез, свойства, применение // Успехи химии, 2006. – Т.75, №10. – С.998 – 1017.
2. Frisch M.J. et.al. // Gaussian – 03, Revision B02, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA 2003.
3. Chao Y., Ninghai S., Shi W. // Structure and spectra of the hydrogen bonding complexes formed by 2-pyridone / Журн. Физ. Химии, 2007. – Т.81, №12, С. 2198 – 2204.
4. Meier R.J. Are current DFT methods sufficiently reliable for real-world molecular systems? // Faraday Discuss, 2003, № 124. – P. 405 – 412.
5. Shaw D.M. Linear scaling for density functional calculations on large molecules with the DeFT software // J. Theor. and Comput. Chem., 2004, № 3. – P.419 – 442.

6. Sumi Tomonari. A cooperative phenomenon between polymer chain and supercritical solvent: Remarkable expansions of solvophobic and solvophilic polymers // J. Chem. Phys., 2005. № 19. – P. 1 – 11.

7. Alizaden R., Najafi N.M. Theoretical study of structure, stability and infrared spectra of hydrogen bonding complexes pairing N-nitrosodietanolamine and one to five water molecules // Жур. Стр. Химии. 2008 -Т. 49, №4 с. 649-654.

8. Дьяконова О.В. Структура и электрохимические свойства частично имидизированных полиамидокислотных мембран. Дисс... канд. химич. наук. – Воронеж: ВГУ, 1999. – 158 с.

---

**Зяблов Александр Николаевич** - доцент кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета; тел. (4732)208-932

**Zyablov Alexander N.** - assistant professor Chair of Analytical Chemistry Voronezh State University; tel.: (4732)208-932; [alex-n-z@yandex.ru](mailto:alex-n-z@yandex.ru)

**Мишина Анастасия Александровна** - студент кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета; тел. (4732)208-932

**Mishina Anastasia A.** - student Chair of Analytical Chemistry Voronezh State University; tel.: (4732)208-932

**Жиброва Юлия Александровна** - аспирант. кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета; тел. (4732)208-932

**Zhibrova Julia A.** - post graduate student Chair of Analytical Chemistry Voronezh State University; tel.: (4732)208-932

**Селеменев Владимир Федорович** - профессор, зав. кафедрой аналитической химии Воронежского государственного университета; тел. (4732)208-362

**Selemeney Vladimir F.** - professor, Head of Chair of Analytical Chemistry Voronezh State University; tel.: (4732)208-932; [common@chem.vsu.ru](mailto:common@chem.vsu.ru)



УДК 543

## О микробных биосенсорах для экспресс-определения БПК сточных вод мясокомбинатов

Перов С.Н., Калач А.В.

*Воронежский институт переподготовки кадров, Воронеж*

Мещерякова О.Л.

*Институт МВД России, Воронеж*

### Аннотация

Дан краткий обзор микробных биосенсоров. Показана необходимость экологического мониторинга сточных вод мясокомбинатов (для определения БПК) с применением микробных биосенсоров. Предпринята попытка обоснования использования актиномицетов в качестве рецепторного элемента биосенсора.

**Ключевые слова:** биосенсор, мониторинг, экспресс-метод

The short review of microbial biosensor controls is given. Necessity of ecological monitoring of sewage of meat-packing plants (for determination of Biological oxygen consumption) with application of microbial biosensor controls is shown. Attempt of a substantiation of use actinomycetes in quality reception a biosensor control element is undertaken.

**Key words:** biosensor, environmental monitoring, express analysis

### Введение

В условиях современного интенсивного промышленного производства значительно возросла нагрузка на объекты окружающей со стороны мясокомбинатов, что выразилось ее значительным загрязнением органическими соединениями. Особенностью состава производственных сточных вод мясокомбинатов является высокое содержание жиров, белков, протеинов и других органических веществ преимущественно устойчивого коллоидного состояния (~ 60 %). Широкий диапазон изменения концентраций загрязнений, высокая неравномерность расхода и предрасположение к быстрому загниванию органических примесей существенно усложняют задачу очистки сточных вод. Сточных вод мясокомбинатов характерны следующие показатели: БПК<sub>5</sub> 2-3 г/дм<sup>3</sup>, соединения азота – 1-2 г/ дм<sup>3</sup>; взвешенные вещества до 1000 мг/л. Следует отметить, что, несмотря на такие высокие концентрации загрязнений в сточных водах мясокомбинатов, подавляющее их количество (~ 80-90 %) сбрасываются практически без очистки [1, 2]. В тоже время выраженная во всем мире тенденция к уменьшению антропогенного воздействия на окружающую среду приводит к ужесточению требований экологического законодательства.

В этой связи возрастающее внимание уделяется экспресс-методам контроля, ориентированным на оценку совокупного воздействия токсикантов на окружающую среду (ОС). Применяемые в настоящее время физико-химические методы (хроматография, масс-спектрометрия, спектральный анализ) достаточно сложны и дорогостоящи и не всегда могут обеспечить необходимую оперативность предоставления информации. Большое внимание уделяется групповым полуколичественным методам анализа, ориентированным на быстрый предварительный контроль опасного уровня загрязнения или превалирующего токсического эффекта. Поставленные цели могут быть достигнуты, прежде всего, путем сочетания биохимических методов диагностики и современной сенсорной базы. Исследования последних лет показали, что в качестве нового эффективного подхода к определению широкого спектра органических соединений, в образцах окружающей среды может быть использован метод биосенсорной детекции. В этой связи интенсивно разрабатываются новые виды биосенсоров для решения задач экологического контроля.

### **Применение биосенсоров в химическом анализе**

Биосенсоры – это аналитические приборы или устройства, предназначенные для идентификации биологических и биохимических элементов, таких как: энзимы, нуклеиновые кислоты, антитела, антигены, микроорганизмы, клетки и др. Эти сенсоры используют биологические материалы для “узнавания” молекул и передают информацию об их наличии и количестве в виде электрического, оптического или магнитного сигнала. Биосенсоры объединяют селективные возможности биологии с технологическим аппаратом современных микроэлектроники, оптоэлектроники и нанотехнологии, создавая таким образом мощные и весьма компактные аналитические устройства для анализа качества окружающей среды [3].

Любой биосенсор состоит из двух функциональных подсистем. Первая – биорецепторная, т.е. селективирующая подсистема, где используют различные биологические структуры, обладающие высоким сродством и избирательностью к соответствующим молекулам – лигандам. Вторая – трансдьюсерная подсистема, которая преобразует биологический сигнал в физический – электрический оптический, магнитный и т.д. Для обработки информации применяют разнообразные микроэлектронные системы, интегрированные с сенсорными на одном и том же чипе. Биосенсоры подразделяются по типу биоселективирующих подсистем и типу трансдьюсеров. Их комбинирование между собой создает большое разнообразие различных типов биосенсоров [3, 4].

Важную роль в решении задач экологического мониторинга отводится микробным биосенсорам, которые перспективны как анализаторы в силу простоты и надежности конструкции, низкой стоимости биологического материала. Уникальной характеристикой микроорганизмов является их способность окислять широкий спектр органических соединений. Это дает возможность относительно простыми способами, используя принцип регистрации клеточного дыхания, формировать биосенсоры для детекции различных органических соединений. Для оценки степени загрязненности воды в настоящее время широко применяется параметр, определенный как “индекс БПК” (индекс биологического потребления кислорода). Классический метод определения БПК основан на тестах, продолжительность которых составляет 5, 10 или 20 суток ( $BPK_5$ ,  $BPK_{10}$  и  $BPK_{20}$

соответственно) [5]. Альтернативой являются экспрессные методы определения *БПК* с использованием биосенсорных анализаторов, основанные на применении микроорганизмов, способных метаболизировать широкий спектр органических соединений [6].

В настоящее время за рубежом промышленно выпускаются биосенсорные анализаторы, позволяющие в течение нескольких минут производить определение *БПК* в диапазоне 2-500 мг/дм<sup>3</sup>, в то время как в России анализаторы этого типа промышленностью не выпускаются [7].

### **Мониторинг промышленных предприятий биосенсорами**

Относительно биосенсорного мониторинга стоков мясокомбинатов можно предположить, что для оценки общего количества органических примесей в стоках целесообразно применение низкоселективных микробных сенсоров, например, на основе активного ила данного водоочистного предприятия, адаптированных к химическому составу тестируемых сточных вод, которые позволят производить оценку индекса *БПК*. Биосенсоры с высокой селективностью не являются инструментом, пригодным для проведения такого анализа; как правило, его выполнению в таких случаях должна предшествовать стадия определенной пробоподготовки или специфической калибровки биосенсора.

Аэробные микроорганизмы-деструкторы при разложении целевого вещества потребляют кислород ( $O_2$ ). Этот процесс можно использовать при создании микробных сенсоров для детекции целевого соединения. Поэтому поиск штаммов, пригодных для использования в биорецепторах сенсоров целесообразно проводить среди штаммов-деструкторов соответствующих соединений. Как показывает опыт последних лет, наиболее практичным преобразователем для измерения содержания молекулярного кислорода в составе сточных вод является электрод типа Кларка, который относится к амперометрическим сенсорам.

Электрохимические реакции, протекающие на поверхности электрода (датчика) в амперометрических сенсорах, генерируют в электродной системе ток, функционально связанный с концентрацией определяемого вещества. Одной из важнейших областей применения амперометрических сенсоров является определение кислорода в воде. Для этого используют электроды Кларка, генерирующие ток, пропорциональный концентрации  $O_2$  [8, 9].

Считается, что концентрация реагента линейно уменьшается в приграничном к поверхности электрода слое практически до нуля на самом электроде, где он восстанавливается или окисляется. Ионы движутся за счет диффузии и каждый ион переносит  $z$  электронов к электроду.

За счет одного процесса диффузии ток нарастает крайне медленно. Чтобы увеличить скорость электрохимической реакции, перемешивают аналит или вращают электроды, в результате чего уменьшается толщина диффузионного слоя. Это особенно важно в случае использования веществ с малыми скоростями диффузии [9].

Перенос электронов может быть ускорен за счет увеличения разности потенциалов между электродами, но существенно повышать ее опасно, так как может произойти электролитическое разложение самого аналита. Более эффективен метод использования *медиаторов* (посредников в переносе электронов).

Для увеличения скорости диффузии также применяют микроэлектроды, в которых диффузия происходит не через плоский слой, а радиально через сферу,

центр которой находится на электроде. В результате скорость реакции увеличивается и стабилизируется. Поэтому данные модификации электродов открывают новые возможности в области создания сенсорных систем [9, 10].

С другой стороны важной задачей при разработке биосенсора для экологического мониторинга стоков является формирование его рецепторного элемента. Одним из основных критериев при выборе штаммов микроорганизмов является наличие у них развитой полиферментативной системы, которая позволяет быстрее адаптироваться к новой среде и гибко реагировать на наличие веществ, обеспечивающих нормальное течение биохимических процессов в клетке. Следует отметить, что в настоящее время в области биологической очистки сточных вод наметилась тенденция к использованию биофлокулянтов, в том числе на основе актиномицетов [5, 6, 11]. Актиномицеты характеризуются высокими темпами размножения, способностью к популяционным взрывам при появлении “экологического вакуума”, слабовыраженной зависимостью наблюдаемой удельной скорости роста от популяционной плотности, что выгодно отличает их от других микроорганизмов.

Поскольку актиномицеты, в частности микроорганизм *Str. chromogenes 0832* ранее показал значительный потенциал в качестве биофлокулянта для очистки сточных вод мясокомбинатов, авторы склонны считать, что его использование в качестве рецепторного элемента биосенсора будет оправданным [11].

Таким образом, дальнейшее направление работы связано с изучением возможности использования актиномицета *Str. chromogenes 0832* в качестве основы биосенсорного анализатора “индекса БПК”, параметры которого не уступают зарубежным аналогам.

Суммируя, можно заключить, что микробные биосенсоры, позволяющие получать и перерабатывать экспресс-информацию о биохимическом составе сточных вод, благодаря своей компактности, высокой чувствительности, малому энергопотреблению, низкой цене и простоте эксплуатации являются перспективными, особенно с точки зрения создания портативных комплексных биочипов. Хотя они находятся в начале своего развития, можно ожидать существенного вклада этих биоэлектронных устройств в повышение качества, контроля технологических процессов, оценки качества окружающей среды и экологического мониторинга.

### Список литературы

- 1.Хенце М. Очистка сточных вод: Пер. с англ. [Текст] / Хенце М., Армоэс П., Ля-Кур-Янсен Й., Арван Э. – М.: Мир. – 2004. – 480 с.
- 2.Шарифуллин В.Н. Процессы сорбции и биоокисления во флокулах активного ила [Текст] / В.Н. Шарифуллин, Н.Н. Зиятдинов // Химическая промышленность. – 2006. – № 3. – С. 11-13.
- 3.Катралл Роберт В. Химические сенсоры [Текст] / Катралл Роберт В. – М.: Научный мир. – 2000. – 230 с.
- 4.Корпан Я. И. Микробные сенсоры: достижения, проблемы, перспективы (обзор) / Я.И. Корпан, А.В. Ельская // Биохимия. – 1995. – Т. 60. Вып. 12. – С. 1988 – 1995.
- 5.Kolenbrander P.E. Surface recognition among oral bacteria: multigenic coaggregations and their mediators / P.E. Kolenbrander // CRC Crit. Rev. Microbiol. – 1999. – V. 17. – P. 137-158.



6. Ohshima H. On the electrophoretic mobility of biological cells / H. Ohshima, T. Kondo // *Biophys. Chem.* – 2001. – V. 39. – P. 191-198.
7. Reshetilov A.N. Biosensoric detection of xenobiotics / Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Makarenko A.A. // Fourth International Workshop “Biosensors and biosensing devices in medicine and environmental sciences”, Tashkent. – 1997. – Uzbekistan. – P. 127.
8. Решетиллов А.Н. Модели биосенсоров на основе потенциометрических и амперометрических преобразователей для использования в медицине, биотехнологии, мониторинге объектов окружающей среды (обзор) / А.Н. Решетиллов // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1996. – Т. 32, № 11. – С. 78–93.
9. Лобанов А.В. Биосенсоры для экологического контроля / Лобанов А.В., Шувалова Ю.В., Зырина Н.В. и др. // *Экологические системы и приборы.* – 2001. – Том 5; № 6. – С.72-76.
10. Makarenko A.A. The p-toluene sulfonate degradation by immobilized *Comamonas testosteroni* BS1310 (pBS1010) cells / Makarenko A.A., Arinbasarova A.Yu., Balashov S.V. at all // *Biocatalysis '98.* – Puschino, 1998. – P. 44.
11. Брындина Л.В. Интенсификация процесса очистки сточных вод мясоперерабатывающих производств / Л.В. Брындина, С.Н. Перов, О.С. Корнеева // *Биотехнология.* – 2006. – № 5 – С. 67-69.

---

**Перов Сергей Николаевич** – к.б.н., доцент кафедры экологии Воронежского института переподготовки кадров

**Калач Андрей Владимирович** – к.х.н., доцент кафедры физики Воронежского института МВД России

**Мещерякова Ольга Леонидовна** - аспирант кафедры физики Воронежского института МВД России

**Perov Sergey N.** - associate professor of Voronezh institute of staff retraining, Voronezh, Russia

**Kalach Andrew V.** - senior lecturer of physical department of Voronezh institute of the Russian ministry of internal affairs, Voronezh, Russia  
e-mail : [a\\_kalach@mail.ru](mailto:a_kalach@mail.ru)

**Mescheryakova Olga L.** - Ph. student of of physical department of Voronezh institute of the Russian ministry of internal affairs, Voronezh, Russia



УДК 541.183.12:547.466

## Получение основных аминокислот из растворов тартратов с одновременным концентрированием методом электродиализа

Елисеева Т.В., Крисилова Е.В.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

### Аннотация

В качестве заключительной стадии процесса химического синтеза основных аминокислот предлагается электромембранный способ их извлечения из растворов солей с D-винной кислотой, используемой для расщепления рацемата. Получены количественные характеристики концентрирования лизина, аргинина и гистидина при электродиализе с биполярными и катионообменными мембранами. Показано влияние гидратации мембраны на концентрирование аминокислот с различными боковыми группами.

**Ключевые слова:** аминокислоты, электродиализ, ионообменные мембраны, концентрирование.

The electromembrane procedure of basic amino acids recovery from the solutions of their salts with D-tartaric acid is suggested as the last stage in the chemical synthesis process. The quantitative characteristics of lysine, arginine and histidine concentration by the electro dialysis have been obtained. The influence of membrane hydration on the amino acids recovery rate has been revealed.

**Key words:** amino acids, electro dialysis, ion-exchange membranes, concentration.

### Введение

При получении оптически активных соединений на основе продуктов химического синтеза важной стадией является расщепление образовавшегося рацемата через диастереомеры, которые, в отличие от антиподов, обычно имеют разные физические свойства [1]. Если рацемат обработать каким-либо доступным оптически активным соединением, которое легко реагирует с обоими антиподами (например, с образованием соли), то в молекулу каждого из них будет введен фрагмент с одинаковой конфигурацией. Таким способом антиподы превращаются в диастереомеры. Их и подвергают разделению, после чего введенные фрагменты удаляют и выделяют чистые оптически активные изомеры.

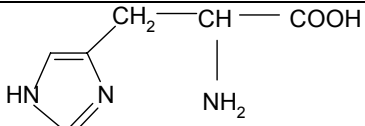
Примером является схема расщепления рацемата лизина (основной аминокислоты) доступной правовращающей винной кислотой [2]. Соли D- и L-аминокислоты отличаются величиной растворимости в метаноле, что позволяет выделить нужный изомер в виде тартрата. Целью настоящей работы является установление сравнительных характеристик процесса электромембранной конверсии

получаемых тартратов L-аминокислот в соответствующие L –аминокислоты с одновременным концентрированием целевого продукта и возвратом винной кислоты на стадию расщепления рацемата. Обычно данную задачу решают методом ионного обмена, однако, это реагентная технология, приводящая к образованию дополнительных сточных вод. С экологической точки зрения проведение электромембранной конверсии солей в аминокислоты более предпочтительно.

## Эксперимент

Методом электродиализа из тартратов получали аминокислоты: лизин, аргинин, гистидин. Некоторые физико-химические характеристики этих основных аминокислот представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики исследуемых аминокислот [3]

| Аминокислота | Структурная формула   | М,<br>г/моль | pI    | pK <sub>1</sub><br>(COOH) | pK <sub>2</sub><br>(α-NH <sub>2</sub> ) | pK <sub>3</sub><br>(R) |
|--------------|---|--------------|-------|---------------------------|---|------------------------|
| Лизин        | $\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_4 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$  | 146,19       | 9,74  | 2,18                      | 8.95                                    | 10.53                  |
| Аргинин      | $\text{H}_2\text{N} - \underset{\text{NH}}{\text{C}} = \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$ | 174,21       | 10,76 | 2,18                      | 9.09                                    | 13.20                  |
| Гистидин     |    | 155,16       | 7,60  | 1,77                      | 9.00                                    | 6.00                   |

Как видно из таблицы, изоэлектрические точки лизина, аргинина и гистидина лежат в щелочной области. Аминокислоты отличаются строением, размером и гидрофильностью боковой цепи. В работе использованы реактивы аминокислот марки «ос.ч». Количественное определение содержания аминокислот проводили методом фотометрии [4]. Относительное стандартное отклонение составляло 0.02-0.03. Для приготовления модельных растворов тартратов аминокислот с исходной концентрацией 0.0125 моль/дм<sup>3</sup> применялась D-винная кислота марки «х.ч». Ее определение осуществляли согласно методике [5] с предварительным установлением возможности независимого измерения в присутствии основных аминокислот. Относительное стандартное отклонение результатов составляло 0.02.

Эксперименты проводили в семикамерной электродиализной ячейке с чередующимися биполярными и катионообменными гетерогенными мембранами. На рис. 1 показана схема лабораторной ячейки с катионообменными мембранами МК-40 и биполярными мембранами МБ-3 (ОАО «Щекино-Азот»). Во 2,4 камеры подавали растворы тартратов аминокислот с линейной скоростью 0.11см/с. Исходные значения pH находились в диапазоне 5.0-6.6. При проведении концентрирования приемные (3,5) камеры (V=20см<sup>3</sup>) делались непроточными. Рабочая площадь мембран составляла 20см<sup>2</sup>. Толщина четных камер – 0.3см. Электродиализатор включался в цепь постоянного тока с источником питания Б5-50, силу тока контролировали амперметром М2007. Эксперименты проводились в гальваностатическом режиме.

Изотермы сорбции воды ионообменными мембранами МК-40 в различных ионных формах получали методом изопиестирования в широком диапазоне активности водяного пара.

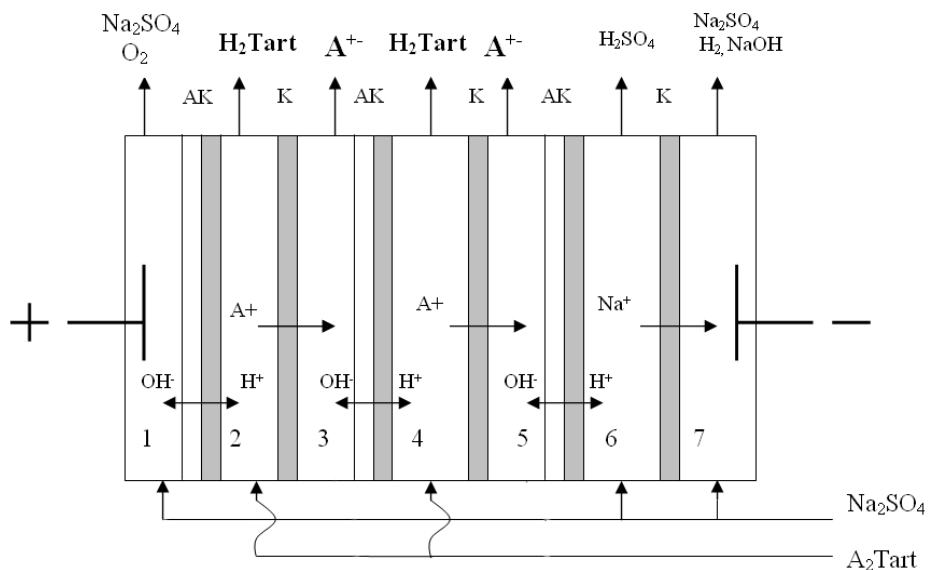


Рис.1 Схема электродиализной ячейки с чередующимися катионообменными мембранами МК-40 и биполярными мембранами МБ-3  
К– катионообменные мембраны, АК – биполярные мембраны

## Обсуждение результатов

Из данных, приведенных в литературе[2], следует, что в процессе разделения рацематов основных аминокислот возможно получение оптически активных солей как в виде тартратов, так и в виде гидротартратов. Ранее было показано[6], что электромембранное выделение основной аминокислоты более эффективно протекает при использовании тартратов, поэтому в экспериментах по концентрированию использованы растворы тартратов лизина, аргинина и гистидина, значения рН в которых находились в диапазоне 5,0-6,6.

При электродиализе модельных растворов генерация ионов водорода биполярной мембраной приводит к снижению рН в четных камерах электродиализной ячейки, на выходе из которых образуется винная кислота. Она может быть возвращена на стадию расщепления рацемата. Основные аминокислоты в виде однозарядных катионов и двухзарядных катионов, образующихся благодаря воздействию  $H^+$ -ионов, генерируемых биполярной мембраной, переносятся в нечетные секции ячейки, где встречаются с гидроксильными ионами, генерируемыми биполярной мембраной. В нечетных секциях показатель кислотности среды после электродиализа соответствует изоэлектрическим точкам выделяемых аминокислот. Возможность получения чистых аминокислот в форме гидратов составляет одно из преимуществ электромембранной конверсии солей.

С целью увеличения степени концентрирования нечетные секции делались непроточными. Для оценки эффективности процесса концентрирования использовалась величина фактора концентрирования  $F = C_{\text{конц}}/C_0$ , где  $C_{\text{конц}}$  – концентрация основной аминокислоты в концентрате, а  $C_0$  – ее концентрация в исходном растворе.

Влияние плотности тока на процесс электродиализного концентрирования лизина, аргинина и гистидина показано на рис. 2.

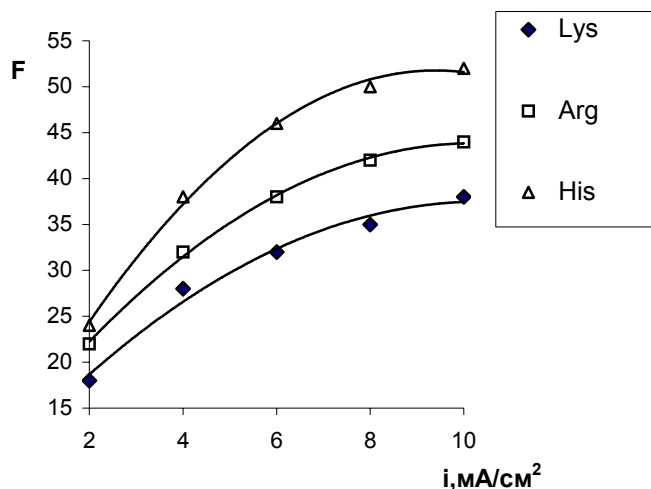


Рис. 2. Зависимость фактора концентрирования аминокислот (F) от плотности тока

При увеличении плотности тока фактор концентрирования растет. В интенсивных токовых режимах растворы основных аминокислот концентрируются в 40-50 раз. Эффективность процесса электродиализного концентрирования ограничена из-за электроосмотического переноса воды через катионообменные мембраны в приемные секции[7]. Из рис. 2 видно, что наибольшей фактор концентрирования во всем диапазоне исследованных токов характерен для гистидина, наименьший – для лизина.

На рис. 3 показаны изотермы сорбции воды катионообменной мембраной МК-40 в водородной форме, а также в лизиновой, аргининовой и гистидиновой формах.

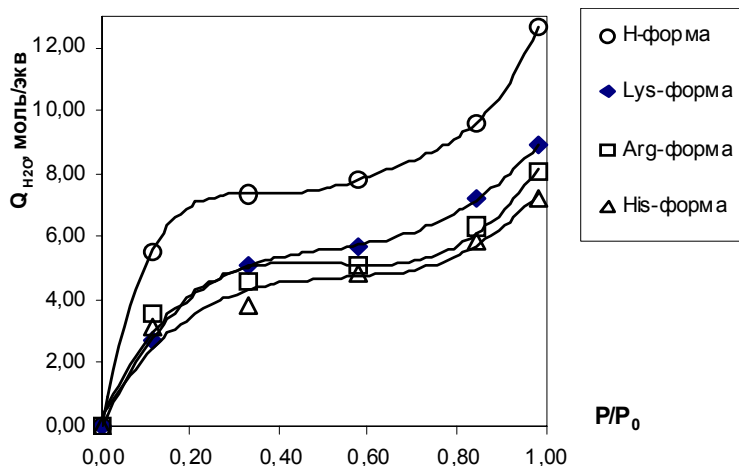


Рис. 3. Изотермы сорбции воды катионообменной мембраной МК-40 в различных формах

Мембрана в гистидиновой форме наименее гидратирована, что позволяет объяснить меньший поток воды в мембране с катионами гистидина и, следовательно, более высокую эффективность его концентрирования. В ряду

гистидин – аргинин – лизин увеличивается гидрофильность аминокислот, мембрана в лизиновой форме в состоянии близком к предельному набуханию ( $p/p_0=0.980$ ) содержит большее количество воды по сравнению с другими аминокислотами.

### Заключение

Метод электродиализа с катионообменными и биполярными мембранами позволяет проводить эффективную конверсию тартратов лизина, аргинина и гистидина в соответствующие аминокислоты. При использовании непроточных приемных камер удастся увеличить концентрацию основных аминокислот в 40-50 раз по сравнению с исходной. Наибольший фактор концентрирования характерен для гистидина, при этом содержание воды в катионообменной мембране в гистидиновой форме в состоянии близком к предельному набуханию меньше, чем в формах других основных аминокислот.

### Список литературы

1. Шабаров Ю.С. Органическая химия. М.: Химия, 2002. 848с.
2. Московец Э.Ф., Эсливанова Г.А., Ваучский Ю.П. Разделение рацемата лизина на оптические изомеры через диастереомерные соли с D-винной кислотой // Разработка промышленных процессов получения аминокислот химическими методами: Сб. науч. тр. Л.: ГИПХ, 1979. С.6-12.
3. Химическая энциклопедия / под ред. И.Л. Кнунянц. М.: Советская энциклопедия, 1988 – 1998. Т. 1, 2, 3. 623 с., 671 с., 639 с.
4. Рошаль Е.Р., Демина Н.Г., Шолин А.Ф. Определение аминокислот в виде комплексов с медью // Химико-фармацевтический журнал. 1988. №6. С.30.
5. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Наука, 1982. 600с.
6. Патент №2223946 Способ получения L-лизина / Т.В. Елисеева, А.Ю. Текучов, В.Ф. Селеменев. пр. 17.10.2002.
7. Заболоцкий В.И., Шудренко А.А., Гнусин Н.П. Транспортные характеристики ионообменных мембран при электродиализном концентрировании электролитов // Электрохимия. 1988. Т.24, №6. С. 744-750.

---

**Елисеева Татьяна Викторовна** – к.х.н., доцент кафедры аналитической химии ВГУ, тел. (4732) 208-932, e-mail: tatyanaeliseeva@yandex.ru

**Eliseeva Tatyana V.** – ph.d., lecturer, Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, phone: (4732) 208-932, e-mail: tatyanaeliseeva@yandex.ru

**Крисилова Елена Викторовна** – аспирант кафедры аналитической химии ВГУ, тел. (4732) 208-932, e-mail: elena.vsu@mail.ru

**Krisilova Elena V.** – post-graduate student, Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, phone: (4732) 208-932, e-mail: elena.vsu@mail.ru



УДК 577.152+577.17: 616.36.002

## Применение методов хроматографии для очистки НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крыс в норме, при введении фактора некроза опухоли $\alpha$ и действии тиоктовой кислоты

Цветикова Л.Н., Попова Т.Н.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

### Аннотация

НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.42; НАДФ-ИДГ) была очищена из печени крыс в норме, при введении фактора некроза опухоли  $\alpha$  и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза, с помощью таких методов, как фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрация через колонку с сефадексом G-25 и Тойоперл HW-65, ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. При этом были получены ферментные препараты с удельной активностью 8,6; 10,7 и 9,4 Е/мг белка соответственно. На очищенных препаратах исследовано влияние аденозинфосфатов на активность НАДФ-ИДГ в условиях нормы и эксперимента.

**Ключевые слова:** хроматография, очистка, печень крысы, апоптоз, НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа, тиоктовая кислота

NADP - isocitrate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.42, NADP-IDH) was purified from rat liver at norm conditions, after introduction of tumor necrosis factor  $\alpha$  and thioctic acid action under apoptosis with help of such methods, as sedimentation by sulfat ammonium, gel-filtration through column with Sephadex G-25 and Toyopearl HW-65, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. At the result enzyme preparations of NADP-IDH with specific activity 8,6; 10,7 and 9,4 E/mg protein were obtained accordingly. The research of influence of adenosine phosphates on enzyme activity with using of purified preparations has been carried out.

**Keywords:** chromatography, purification, rat liver, apoptosis, NADP- isocitrate dehydrogenase, thioctic acid

### Введение

Одним из универсальных факторов повреждения печени является провоспалительный цитокин - фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), который, вырабатываясь в повышенных количествах, вызывает апоптоз гепатоцитов [1]. Инициация реакций, приводящих к программированной гибели клеток, сопряжена с развитием оксидативного стресса (ОС) и во многом зависит от антиоксидантного потенциала клетки.

В связи с этим вызывает интерес НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.42; НАДФ-ИДГ), так как в ходе реакции, катализируемой данным ферментом, происходит образование НАДФН, необходимого для нормального

функционирования глутатионредуктазной/ глутатионпероксидазной (ГР/ГП) ферментной антиоксидантной системы. Рядом авторов проводились исследования влияния различных антиоксидантов на протекание свободнорадикальных процессов при патологических изменениях печени. Так, имеются сведения, что тиоктовая кислота (ТК) — естественный клеточный метаболит, содержащийся во многих органах и тканях человека, обладает гепатопротекторным действием [2].

Поскольку исследования, проводимые на высокоочищенных ферментных препаратах, позволяют наиболее адекватно оценить вклад той или иной ферментативной реакции в регуляцию и координацию метаболических процессов, то разработка эффективной методики очистки ферментов является важной частью процесса изучения физико-химических свойств и кинетических параметров действия биологических катализаторов.

Таким образом, целью настоящей работы явилось разработка метода очистки НАДФ-ИДГ и исследование участия аденозинфосфатов в регуляции активности данного фермента из печени крыс в норме, при введении ФНО- $\alpha$  и действии тиоктовой кислоты.

### Теоретическая часть

В последние годы показано, что в развитии апоптоза ведущую роль играют активные формы кислорода (АФК) [3]. В тоже время установлено, что быстрое возрастание внутриклеточного уровня АФК в различных типах клеток может быть вызвано стимуляцией рецепторов ФНО- $\alpha$ . ФНО- $\alpha$  представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 17,4 кДа. Молекулы ФНО гомологичны Fas-лиганду, мембранным молекулам CD40, CD30, фактору роста нервов и образуют особое семейство белков [4]. ФНО- $\alpha$  проявляет многочисленные иммуномодулирующие и провоспалительные эффекты, подавляющее большинство из которых могут иметь фундаментальное значение в иммунопатологии многих заболеваний. Несмотря на очевидную взаимосвязь ОС с апоптозом, роль АФК в саморазрушении клеток и механизмы реализации цитотоксичности не ясны. Более того, нет однозначного ответа на вопрос: чем является ОС— следствием или индуктором функциональных изменений, сопровождающих развитие апоптоза. Однако, согласно современным представлениям ключевым механизмом развития многих видов заболеваний являются мембраноповреждающие процессы в организме. Известно, что при многих заболеваниях эффективным протектором является ТК. В организме ТК образует динамичную окислительно-восстановительную систему, которая участвует в переносе ацильных групп в составе многокомпонентных ферментных систем [5].

ТК играет важную роль коэнзима в пируватдегидрогеназном ферментном комплексе. Она участвует в окислительном декарбоксилировании пирувиноградной кислоты и кетокислот, регулирует процесс образования энергии в клетке, являясь незаменимым компонентом реакций углеводного, липидного обмена, метаболизма холестерина [6].

Антиоксидантный эффект ТК обусловлен наличием 2 тиоловых групп в молекуле, а также способностью связывать молекулы радикалов и свободное тканевое железо.

Благодаря своим свойствам восстанавливать запасы глутатиона, предотвращать повреждение митохондрий и гибель клеток, обусловленную воздействием ФНО, ТК нашла широкое применение в гастроэнтерологии, кардиологии, эндокринологии [1].



Изоцитратдегидрогеназа катализирует окислительное декарбоксилирование D,L — трео-Ds- изоцитрата (ИЦ) в 2-оксоглутарат (2-ОГ) [7]. Продукт реакции, катализируемой ИДГ, 2-ОГ, имеет важное значение в процессах образования аминокислот в реакциях переаминирования, и на уровне 2-ОГ, происходит пересечение основных путей углеродного и азотного обмена.

НАДФ-ИДГ присутствует во многих тканях, при этом, наибольшее ее содержание отмечается в сердце, печени и скелетной мускулатуре. В основном НАДФ-ИДГ находится в цитоплазме клетки (около 90 %) и лишь небольшое количество присутствует в митохондриях [8].

Считается, что для проявления активности НАДФ-ИДГ ключевое значение имеют следующие аминокислотные остатки: цистеин, метионин, глутамин, лизин [9]. Было показано, что в нативном ферменте две SH-группы, приходящиеся на одну субъединицу, легко доступны и несущественны для каталитической активности НАДФ-ИДГ, еще две SH-группы в активном центре полностью защищены субстратом (Mn-ИЦ) и существенны для проявления активности фермента. Предполагается, что остатки цистеина и глутаминовой кислоты ответственны за связывание комплекса [ИЦ -  $Mn^{2+}$ ], тогда как метионин участвует в связывании НАДФН.

Для НАДФ-ИДГ из некоторых объектов было показано что фермент представляет собой диссоциирующую ферментную систему типа мономер -димер, в которой мономерная форма неактивна. Это характерно для НАДФ-ИДГ из сердца свиньи и печени быка [10].

## Эксперимент

В качестве объекта исследования использовались самцы белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 180-200 г, содержащиеся на стандартном режиме вивария. Для индукции апоптоза животным вводили актиномицин D внутривентриально в дозе 20мкг на кг веса животного, а затем через 20 минут вводили ФНО- $\alpha$  (1мкг/кг) [11]. ТК после индуцирования апоптоза вводили внутривентриально (16 мг/кг) [12], трехкратно, с интервалом 3 часа. Исследование протекторной функции ТК проводили через 12 часов после введения ФНО- $\alpha$ , что было связано с максимальным уровнем развития свободнорадикальных процессов и степени цитолиза гепатоцитов к этому времени [13].

Очистка НАДФ-ИДГ из печени интактных крыс и животных, которым вводили ФНО- $\alpha$  и ТК, включала ряд стадий:

1. Гомогенизацию материала проводили в среде выделения НАДФ-ИДГ следующего состава: 50 ммоль/л трис-HCl-буфер, pH 7,8, содержащий 1,5 ммоль/л ИЦ, 2 ммоль/л  $MnCl_2$ , 0,1 ммоль/л ЭДТА, 1%  $\beta$  - меркаптоэтанол ( $\beta$  -МКЭ). Гомогенат процеживали и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Супернатант использовали для определения активности и последующей очистки НАДФ-ИДГ.

2. Фракционирование белков сульфатом аммония. Определение границ выделения НАДФ-ИДГ из белкового раствора проводили путем ступенчатого повышения концентрации  $(NH_4)_2SO_4$  в смеси. Кристаллический сульфат аммония добавляли к гомогенату в количестве, соответствующем нижней границе насыщения (25% в условиях введения ФНО- $\alpha$  и действия ТК на фоне развития апоптоза и 35% - в норме). Смесь центрифугировали при 10000g в течение 10 мин. Затем к супернатанту добавляли соль в количестве, соответствующем верхнему пределу

насыщения (60% и 75% в условиях эксперимента и нормы соответственно). После центрифугирования при 15000g в течение 25 минут получали осадок, содержащий НАДФ-ИДГ. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме исходной среды выделения. Затем белковую смесь освобождали от низкомолекулярных примесей с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25.

3. Гель-фильтрация на сефадексе G-25. Сефадекс G-25 (Fine) применяли для освобождения ферментных препаратов от низкомолекулярных примесей. Перед использованием сефадекс замачивали в дистиллированной воде для набухания на 3-4 часа. Суспензию геля заливали в установленную строго вертикально колонку размером 1,4 x 20 см. Ферментные образцы наносили в количестве не более 20-25% от объема колонки. Скорость элюции составляла 25-30 мл в час, ее регулирование осуществлялось путем изменения гидростатического давления. В качестве элюирующей среды для НАДФ-ИДГ при гель-фильтрации на G-25 использовали 10 ммоль/л трис-HCl-буфер, pH 7.6-7,8, содержащий 1,5 ммоль/л ИЦ, 2 ммоль/л  $MnCl_2$ , 0,1 ммоль/л ЭДТА и 1%  $\beta$ -МКЭ. Каждую фракцию объемом 2-3 мл анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

4. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Для последующей очистки ИДГ применяли ионообменную хроматографию (ИОХ) на ДЭАЭ-целлюлозе. Перед использованием ионообменник подвергали специальной обработке: на каждый грамм сухого вещества добавляли 30 мл дистиллированной воды и оставляли набухать в течение 3-4 часов. Затем выдерживали в течение часа в 0,5N NaOH, потом в 0,5N HCl и снова в 0,5N NaOH. После каждой стадии обработки ионообменник отмывали на воронке Бюхнера дистиллированной водой до нейтрального значения pH промывных вод. ДЭАЭ-целлюлозу дегазировали, помещали в колонку (1,2 x 10 см) и уравнивали в течение 8-10 часов элюирующей средой. На колонку наносили ферментный препарат, предварительно освобожденный от низкомолекулярных примесей при помощи гель-фильтрации на сефадексе G-25. Среды элюции, используемые при ИОХ, имели тот же состав, что и при гель-фильтрации на сефадексе G-25. После сорбции белка на колонке проводили десорбцию фермента с помощью ступенчатого градиента KCl в той же среде элюции. Для десорбции НАДФ-ИДГ из печени здоровых крыс и животных, которым вводили ТК на фоне развития апоптоза использовали ступенчатый градиент KCl от 40 до 80 ммоль/л. Для очистки НАДФ-ИДГ из печени крыс с индуцированным апоптозом использовали ступенчатый градиент KCl от 20 до 50 ммоль/л. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час. Фракции, относящиеся к пику активности, объединяли для дальнейшей очистки.

5. Гель-хроматография на Toyoperl HW-65. Приготовление колонки с Toyoperl HW-65 осуществляли следующим образом: методом декантации удаляли мелкие частицы, затем суспензию геля в рабочем буфере заливали в колонку 2 x 60 см. С помощью перистальтического насоса удаляли избыток буфера из колонки, при этом наблюдали за равномерным осаждением геля. Колонку уравнивали средой элюции, имеющей тот же состав, что и при гель-фильтрации на сефадексе G-25 и при ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе. На колонку наносили ферментный препарат объемом не более 1-3% от общего объема колонки. Элюцию проводили со скоростью 30 мл/час, каждую фракцию анализировали на присутствие ферментативной активности.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически при длине 340 нм. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента,

катализирующего образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Среда для определения активности НАДФ-ИДГ имела следующий состав: 50 ммоль/л трис-НС1-буфер (рН 7,6-7,8), содержащий 1,5 ммоль/л изоцитрат, 2 ммоль/л  $MnCl_2$ , 0,25 ммоль/л НАДФ, 0,1 ммоль/л ЭДТА.

Общий белок определяли по методу Лоури.

Опыты проводили в 3-4-х кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух-трех повторностях. Для статистической обработки данных применяли стандартные статистические методы.

## Обсуждение результатов

Результаты очистки НАДФ-ИДГ из печени контрольных и экспериментальных групп крыс представлены в таблице 1. На начальных стадиях очистки с целью отделения низкомолекулярных примесей от белкового препарата, полученного после фракционирования сульфатом аммония, была использована гель-хроматография на сефадексе G-25. Хотя хроматография на данном носителе не позволяет осуществить разделение высокомолекулярных веществ, на этой стадии очистки нам удалось освободиться от  $\approx 15\%$  белков. Это может быть объяснено тем, что для дальнейшей очистки нами использовались только фракции, обладающие наибольшей активностью фермента. Основное значение для отделения посторонних белков имели стадии ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-фильтрации на Тойоперл HW-65. Так, после ИОХ содержание белка по сравнению с гомогенатом снизилось в 40 раз в норме, в 33 и 30 раза при введении ФНО- $\alpha$  и ТК на фоне развития апоптоза соответственно. Десорбция НАДФ-ИДГ с колонки с ДЭАЭ-целлюлозой происходила при увеличении концентрации КС1 в среде элюции с 20 до 80 мМ (рис. 1). Следует отметить, что на данном этапе очистки ферментного препарата наблюдались изменения хроматографических свойств НАДФ-ИДГ, выделенной из печени крыс при введении ФНО- $\alpha$ , по сравнению с условиями нормы и действия ТК, а именно, происходило изменение границ градиента КС1 при патологии, что может быть следствием конформационных модификаций фермента при введении крысам цитокина. После заключительного этапа выделения фермента с использованием Тойоперл HW-65 степень очистки по белку составила 703; 587 и 564 раза в норме, при введении ФНО- $\alpha$  и ТК соответственно.

Таким образом, в результате 96,0-; 76,0- и 93,5-кратной очистки были получены ферментные препараты НАДФ-ИДГ из печени контрольных крыс и животных, которым вводили ФНО- $\alpha$  и ТК на фоне развития апоптоза с удельной активностью 8,6; 10,7 и 9,4 Е/мг белка и выходом 13,1; 12,1 и 15,7% соответственно (табл.1).

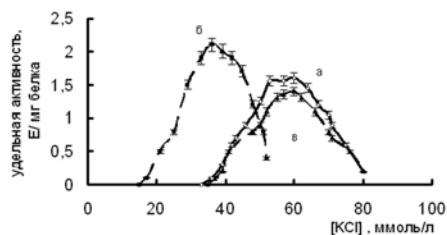


Рис.1. Десорбция НАДФ-ИДГ, выделенной из печени крыс в условиях нормы (а), при введении ФНО- $\alpha$  (б) и действии ТК на фоне апоптоза (в), с колонки ДЭАЭ-целлюлозы

Высокий выход фермента свидетельствует о том, что используемая комбинация хроматографических методов позволяет выделить чистый ферментный препарат с относительно небольшими потерями.

С использованием полученных гомогенных препаратов в настоящей работе было проведено исследование влияния АТФ, АДФ и АМФ на функционирование НАДФ-изоцитратдегидрогеназы из гепатоцитов крысы.

При 0,4 мМ концентрации АТФ активность НАДФ-ИДГ из печени интактных крыс уменьшается в 2,2 раза, а при введении ФНО- $\alpha$  в 1,2 раза по сравнению с первоначальным уровнем. При введении ТК на фоне развития апоптоза наблюдается усиление ингибирующего действия АТФ по сравнению с данными при развитии апоптоза, так активность НАДФ-ИДГ из печени крыс в условиях оксидативного стресса и действия ТК на фоне апоптоза составляет 85% и 64% соответственно (рис. 2а).

АДФ также оказывает неравнозначный эффект на активность НАДФ-ИДГ, выделенной из печени крыс в условиях нормы, действия ФНО- $\alpha$  и ТК. Так, при 0,2 мМ концентрации АДФ активность данного фермента составила 98%, 110% и 86% соответственно. При увеличении концентрации АДФ в 4 раза происходит ингибирование фермента во всех исследованных группах, при этом активность данного фермента падает в условиях нормы, действия ФНО- $\alpha$  и ТК в 2,4; 1,5 и 1,3 раза соответственно (рис. 2б).

В диапазоне концентраций АМФ 0,1-0,6 мМ активность НАДФ-ИДГ возрастает под действием данного метаболита во всех экспериментальных группах. Так, при 0,3 мМ активность фермента составляет 134%, 114% и 120% в условиях контроля, индукции апоптоза и действия ТК соответственно. Следует отметить, что ТК усиливает действие АМФ на данный фермент по сравнению с патологией (рис. 2в).

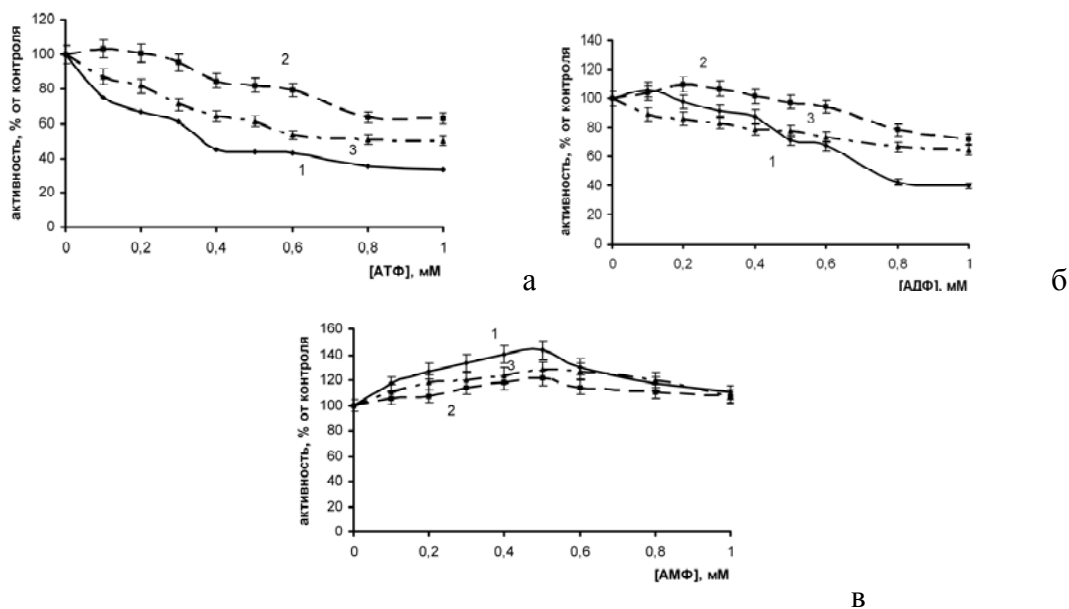


Рис. 2: Влияние АТФ (а), АДФ (б) и АМФ (в) на активность НАДФ-ИДГ из печени контрольных крыс(1), животных, подвергшихся введению ФНО- $\alpha$  (2) и крыс, которым вводили тиоктовую кислоту на фоне развития апоптоза (3)

Таблица 1. Очистка НАДФ - зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крысы в норме, при введении ФНО- $\alpha$  и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза

| Стадия очистки   | Условия опыта  | Общая активность, Е | Количество белка, мг | Удельная активность, Е/мг белка | Выход, % | Степень очистки |
|--|--|---------------------|----------------------|---------------------------------|----------|-----------------|
| Гомогенат  | Норма  | 6,95±0,32           | 77,33±3,93           | 0,09±0,01                       | (100)    | (1)             |
|  | Введение ФНО- $\alpha$   | 10,54±0,54          | 76,26±3,72           | 0,14±0,01                       |          |                 |
|  | Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- $\alpha$ | 7,84±0,25           | 73,34±3,5            | 0,11±0,01                       |          |                 |
| Фракционирование (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Норма  | 5,67±0,28           | 18,82±0,96           | 0,30±0,02                       | 81,6     | 3,4             |
|  | Введение ФНО- $\alpha$   | 8,62±0,33           | 19,00±0,85           | 0,45±0,02                       | 81,1     | 3,2             |
|  | Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- $\alpha$ | 5,92±0,24           | 18,11±0,90           | 0,33±0,02                       | 75,5     | 3,3             |
| Гель-фильтрация на сефадексе G-25                                | Норма  | 5,65±0,25           | 15,26±0,25           | 0,37±0,02                       | 81,2     | 4,1             |
|  | Введение ФНО- $\alpha$   | 8,72±0,35           | 15,65±0,24           | 0,55±0,02                       | 81,8     | 3,9             |
|  | Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- $\alpha$ | 6,00±0,27           | 14,00±0,25           | 0,42±0,02                       | 76,5     | 4,2             |
| Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе                     | Норма  | 3,03±0,16           | 1,95±0,09            | 1,55±0,07                       | 43,5     | 17,2            |
|  | Введение ФНО- $\alpha$   | 4,81±0,25           | 2,34±0,10            | 2,05±0,1                        | 45,6     | 15,8            |
|  | Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- $\alpha$ | 3,25±0,17           | 2,46±0,14            | 1,32±0,07                       | 41,4     | 12,0            |
| Хроматография на Toyoperl HW-65                                  | Норма  | 0,91±0,04           | 0,11±0,01            | 8,64±0,4                        | 13,1     | 96,0            |
|  | Введение ФНО- $\alpha$   | 1,35±0,05           | 0,13±0,01            | 10,64±0,5                       | 12,1     | 76,0            |
|  | Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- $\alpha$ | 1,25±0,05           | 0,13±0,01            | 9,35±0,5                        | 15,7     | 93,5            |

Примечание: в таблицах 1-3 отличия от нормы достоверны ( $p < 0.05$ )

На основании полученных данных можно сделать вывод, что АТФ и АДФ оказывают ингибирующий эффект, а АМФ - активирующий эффект в условиях нормы и патологического состояния. Однако введение ТК способствовало усилению ингибирующего эффекта АТФ и АДФ по сравнению с данными при патологии. Вероятно, различие в действии аденозинфосфатов связано с особенностями регуляции НАДФ-ИДГ в условиях нормы и при введении ФНО- $\alpha$ . Это можно объяснить изменениями метаболизма клетки в условиях апоптоза. Действие ТК объясняется ее антиоксидантными свойствами, что способствует нормализации биохимических параметров на фоне развития апоптоза.

### **Заключение**

Таким образом, с использованием разработанной схемы очистки фермента, включающей различные виды хроматографии, были получены высокоочищенные препараты НАДФ-ИД из печени крыс в условиях нормы, при введении ФНО- $\alpha$  и действии тиоктовой кислоты. Для НАДФ-ИДГ из печени животных исследованных групп выявлены различия в хроматографических свойствах и регуляции активности аденозинфосфатами.

*Работа поддержана финансированием Министерства образования и науки РФ по программе «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.4429*

### **Список литературы**

1. Шульпекова Ю.О., Ивашкин В.Т. Применение тиоктовой кислоты в гастроэнтерологии // Российский медицинский журнал. 2000. Т. 8, №15-16. С. 125-138.
2. Оковитый С.В., Шуленин С.Н. Клиническая фармакология гепатопротекторов. СПб. 2006. 80 с.
3. Саприн А.Н., Калинина Е. В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биологической химии. 1999. Т. 39. С. 289-326
4. Zhang M., Tracey K.J. Tumor necrosis factor //The cytokine handbook, 3rd ed. New York. Academic press, 1998. 515 p.
5. Рахманова Т. И., Попова Т.Н. Исследование влияния различных доз тиоктовой кислоты на активность глутатионовой системы в печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите // Вестник ВГУ. 2005. №2. С. 87-90.
6. Пальцев М. А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук // Вестник Российской Академии Наук. 2002. Т. 72, №1. С. 13-21.
7. Попова Т.Н. Изоцитратдегидрогеназы: формы, локализация, свойства и регуляция // Биохимия. 1993. Т.58, №126. С. 1861-1879.
8. Bednar R.A., Colman R.F. Chemical modification aprobe of the structure and function of the subunits of DPN-dependent isocitrate dehydrogenase //J. Biol. Chem. 1982. V.257, № 19. P. 11734-11739

9. Popova T.N., Pinheiro de Carvalho M.A.A. Citrate and isocitrate in plant metabolism //Biochim. et Biophys. Acta. 1998. V.1364, №3. P.307-325.
10. H.Carlier M.F., Pantaloni D. NADF - linked isocitrate dehydrogenase from beef liver. Purification, quaternary structure and catalytic activity //Eur.J.Bio-chem. 1973.V.37, №4.P. 341-354.
11. Zhao Y., Li Sh., Childs E., Kuharsky K. and Yin X. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced liver injury // The J. of Biolog. Chem. 2001. T. 276, N. 29.P. 27432-27440.
12. Бустаманте Дж., Лодж Дж., Маркоччи Л. Метаболизм  $\alpha$ -липоевой кислоты в печени при различных формах патологии // Международный медицинский журнал. 2001. № 2. С. 133-141.
13. Попов С.С., Пашков А.Н. Семенихина А.В., Рахманова Т. И., Попова Т.Н., Сущенко Е.А. Влияние мелатонина на параметры биоохемиллюминесценции в сыворотке крови при введении фактора некроза опухоли- $\alpha$  // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования, создание новых физиологически активных веществ: мат. 5-й научно-метод. конф, Воронеж. 2007. С. 382-384.

---

**Цветикова Любовь Николаевна** – аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, тел. 4732) 208-278

**Tsvetikova Lyubov** – postgraduate of biology and soil science faculty, department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh state university, e-mail: [tsvn@front.ru](mailto:tsvn@front.ru)

**Попова Татьяна Николаевна** - д.б.н., проф., зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, тел. (4732) 208-278

**Popova Tatiana N.** - Doctor of biology, head of the department of medical biochemistry and microbiology, professor, Voronezh state university



УДК 577.152:616.36-002

## Применение хроматографических методов для очистки цитоплазматической НАД-зависимой малатдегидрогеназы из печени крыс в норме и при токсическом гепатите

Михайлова Е.В., Сафонова О.А., Попова Т.Н.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

### Аннотация

С использованием методов дифференциального центрифугирования, гель-фильтрации через сефадекс G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-фильтрации на Тойоперл HW-65 очищена в 77,7 и 82,9 раз НАД-зависимая малатдегидрогеназа (НАД-МДГ, КФ 1.1.1.37) из гепатоцитов крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ) соответственно. На очищенных препаратах исследовано влияние некоторых интермедиатов цикла трикарбоновых кислот в норме и при патологии.

**Ключевые слова:** НАД-зависимая малатдегидрогеназа, печень крысы, токсический гепатит, очистка, хроматография, регуляция активности

Cytoplasmic NAD-depended malate dehydrogenase (NAD-MDH; EC 1.1.1.37) has been purified in 77,7 and 82,9 times from hepatocytes at norm and under toxic hepatitis (ETH) with using methods of differential centrifugation, gel-filtration on Sephadex G-25 and Toyopearl HW-65, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. The research of influence of some tricarboxic cycle intermediates on enzyme activity with using of purified preparations has been carried out.

**Key words:** NAD-depended malate dehydrogenase, rat liver, toxic hepatitis, purification, chromatography, activity regulation

### Введение

В настоящее время одной из актуальных проблем физико-химической биологии является исследование функционирования ферментов центрального метаболизма при патологиях, сопряженных с окислительным стрессом. К развитию окислительного стресса, являющегося универсальным неспецифическим звеном патогенеза ряда заболеваний, включая патологии печени, приводит интенсификация свободнорадикального окисления (СРО). [1]. В связи с этим привлекает интерес НАД-зависимая малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37; НАД-МДГ), субстрат которой – малат – играет значительную роль в биохимической адаптации организма к гипоксии [2]. Имеются данные о способности малата диффундировать в митохондрии, передавая восстановительные эквиваленты в электрон-транспортную цепь (ЭТЦ), и повышать коэффициент дыхательного контроля. Известно также, что



малат участвует в транспорте низкомолекулярного антиоксиданта – цитрата, через биологические мембраны [3]. Антиоксидантную активность цитрата связывают с его хелатирующими свойствами по отношению к ионам металлов переменной валентности путем образования хелатных комплексов типа  $[Me_2(\text{цитрат})_2(\text{OH})_4]^{4-}$ . Поскольку для исследования свойств любого фермента необходимо получение его в высокоочищенном состоянии, то актуальным остается разработка эффективной процедуры очистки, в которой важное место отводят хроматографическим методам. В связи с вышесказанным с помощью комбинации методов хроматографии на различных носителях была проведена очистка и исследованы некоторые регуляторные свойства НАД-МДГ из цитоплазмы печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ).

### Теоретическая часть

Никотинамидадениндинуклеотид-зависимая малатдегидрогеназа (НАД-МДГ; КФ 1.1.1.37) катализирует обратимую реакцию окисления L-малата в оксалоацетат (ОА). НАД-МДГ является ферментом, имеющим универсальное распространение в органическом мире: она обнаружена в клетках микроорганизмов, грибов, растений, животных. Содержание МДГ может различаться в разных тканях. В клетках животных присутствуют по крайней мере две фракции активности фермента: одна из них локализуется в митохондриях, другая – в цитоплазме. Имеются данные, что митохондриальная и цитоплазматическая формы фермента кодируются разными генами, т.е. являются изоферментами [4]. При исследовании влияния пищевой депривации на функционирование МДГ в печени крыс установлена индукция МДГ-активности и появление новой пероксисомальной изоформы, причем для пероксисомальной и цитозольной формы установлено сходство [5]. Показана достаточно низкая степень сходства для первичной структуры МДГ из различных источников. Исключение составляют некоторые участки, важные для проявления каталитической активности, связывания коферментов и формирования поверхности субъединиц. Так, существуют три остатка аргинина (Arg-102, Arg-109, Arg-171), которые высококонсервативны во всех МДГ и имеют большое значение для связывания субстрата и катализа [6]. По литературным данным, МДГ - группа мультимерных ферментов, состоящих из идентичных субъединиц (30-35 кДа), обычно организованных или как димеры или как тетрамеры [7]

### Эксперимент

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 180-200 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария. ЭТГ моделировали путем однократного перорального введения  $CCl_4$  (64 мкл на 100 г веса крысы) в вазелиновом масле в пропорции 1:3 после суточной пищевой депривации. На 4-е сутки печень после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором извлекали у животных и использовали для дальнейших исследований

Выделение и очистку НАД-МДГ осуществляли по схеме, включающей несколько стадий: после гомогенизации ткани печени цитоплазматическую и митохондриальную фракции гепатоцитов разделяли методом дифференциального центрифугирования в режиме 15000 g в течение 15 минут [8]. Для освобождения

ферментных препаратов НАД-МДГ от низкомолекулярных примесей использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (Fine). Суспензию геля помещали в колонку размером 1,4x20,0 см. В качестве элюирующей среды использовали 10 мМ трис-НСI-буфер (рН 8,3), содержащий 1 мМ ЭДТА и 2 мМ β-меркаптоэтанол. Собирали фракции объемом 3 мл и анализировали их на присутствие ферментативной активности. Фракции с максимальной ферментативной активностью объединяли и подвергали ионообменной хроматографии (ИОХ) на ДЭАЭ-целлюлозе. Перед использованием ионообменник подвергали специальной обработке. На каждый грамм сухого вещества добавляли 30 мл дистиллированной воды и оставляли набухать в течение 3 – 4 часов. Затем выдерживали в течение часа в 0,5 Н NaOH, потом в 0,5 Н HCl, и снова в 0,5 Н NaOH. После каждой стадии обработки ионообменник отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения рН промывных вод [9]. Заряженный ионообменник помещали в колонку размером 1,0 x 13,0 см и уравнивали элюирующей средой вышеуказанного состава. После нанесения ферментного препарата на сорбент колонку промывали 20 мл среды элюции. Элюцию фермента проводили путем ступенчатого повышения концентрации KCl в среде элюции. Каждую фракцию объемом 2 мл анализировали на присутствие ферментативной активности НАД-МДГ. Фракции, характеризующиеся максимальной активностью, использовали для дальнейших исследований. Отделение фермента от близких по размеру и молекулярной массе белковых фракций осуществляли путем гель-фильтрационной хроматографии через Тойоперл HW-65. Суспензию геля, уравновешенную средой элюции того же состава, что и на предыдущих стадиях с добавлением 100 мМ KCl, помещали в колонку размером 1,4x64см. Калибровку колонки с Тойоперл HW-65 осуществляли с помощью набора белков-метчиков с известными молекулярными массами. Ферментный препарат наносили в объеме 2 мл. Элюцию проводили со скоростью 20 мл/час с помощью перистальтического насоса. Каждую фракцию объемом 1-2 мл анализировали на наличие ферментативной активности. Оценку чистоты полученных после заключительной стадии очистки ферментных препаратов проводили методом электрофореза в ПААГ [12], используя для проявления на белок нитрат серебра.[13]. Полученные очищенные препараты использовали для исследования свойств фермента. Все этапы выделения и очистки осуществляли при температуре 0-4<sup>0</sup>С.

Активность НАД-МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм в среде 50 мМ трис-НСI буфера, рН 8,3, содержащего 0,2 мМ оксалоацетат, 0,15 мМ НАДН. Оценку степени перекрестного загрязнения цитоплазматической и митохондриальной фракций проводили с помощью определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ; маркера митохондрий) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ; маркера цитоплазмы). Активность СДГ определяли при 600 нм [10]; активность ЛДГ - при 340 нм [9].

Общий белок определяли по методу Лоури [11].

Опыты проводили в 3-4-х кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух-трех повторностях. Для статистической обработки данных применяли стандартные статистические методы [14].

## Обсуждение результатов

В соответствии с полученными нами данными, в условиях токсического гепатита, вызванного введением  $CCl_4$ , не наблюдается достоверных изменений активности цитоплазматической НАД-МДГ по сравнению с нормой. Но, поскольку в условиях развития патологий, сопряженных с оксидативным стрессом, в связи с нарушением функционирования метаболических систем изменяется концентрация многих интермедиатов клеточного обмена, то нельзя исключить, что, несмотря на выявленную стабильность активности НАД-МДГ, изменение микроокружения может отражаться на некоторых свойствах фермента. В связи с этим нами была осуществлена очистка фермента из печени контрольных животных и крыс с ЭТГ с использованием разработанной схемы и исследован ряд регуляторных свойств НАД-МДГ в норме и при патологии.

Методом дифференциального центрифугирования была изучена субклеточная локализация НАД-МДГ в гепатоцитах в условиях нормы и ЭТГ. Результаты исследований представлены в табл.1. Показано, что активность фермента связана как с цитоплазматической, так и с митохондриальной фракциями. При этом около 90% активности НАД-МДГ клеток печени крысы локализовано в цитоплазме, и около 10% - в митохондриях. Распределение активности маркерных ферментов цитоплазмы и митохондрий (ЛДГ и СДГ соответственно) свидетельствует о том, что степень перекрестного загрязнения цитоплазматической и митохондриальной фракции клеток печени составила не более 10%.

Таблица 1. Распределение активности НАД-МДГ по субклеточным фракциям

| Формы НАД-МДГ      | Условия опыта | Е/г сырой массы | Удельная активность, ФЕ/мг белка | % от общей активности |
|--------------------|---------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------|
| Цитоплазматическая | Норма         | 49,08           | 0,968                            | 89,69                 |
|                    | ЭТГ           | 46,99           | 0,916                            | 90,72                 |
| Митохондриальная   | Норма         | 5,64            | 0,705                            | 10,31                 |
|                    | ЭТГ           | 4,79            | 0,614                            | 9,25                  |

Результаты очистки НАД-МДГ из цитоплазмы клеток печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс представлены в таблице 2. На начальных стадиях очистки с целью отделения низкомолекулярных примесей от белкового препарата была использована гель-хроматография на сефадексе G-25. Хотя хроматография на данном носителе не позволяет отделить одни высокомолекулярные вещества от других, на этой стадии очистки нам удалось освободиться от  $\approx 30\%$  белков. Это может быть объяснено тем, что для дальнейшей очистки нами использовались только фракции, обладающие наибольшей активностью фермента. Основное значение для отделения посторонних белков имели стадии ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе и гель фильтрации на Тойоперл НВ-65. Так, после ИОХ содержание белка по сравнению с цитоплазмой снизилось в 21 раз в норме и 24 раза при патологии. Десорбция НАД-МДГ с колонки ДЭАЭ-целлюлозы происходила при увеличении концентрации  $KCl$  в среде элюции с 35 до 80 мМ. После заключительного этапа выделения фермента с использованием Тойоперл НВ-65 степень очистки по белку составила 298 и 302 раза в норме и при ЭТГ соответственно.

Таблица 2. Очистка цитоплазматической НАД-зависимой малатдегидрогеназы из печени контрольных животных и крыс с токсическим гепатитом

| Стадия очистки                               | Условия опыта | Активность, Е | Количество белка, мг | Удельная активность, Е/мг белка | Выход, % | Степень очистки |
|--|---------------|---------------|----------------------|---------------------------------|----------|-----------------|
| Цитоплазматическая фракция                   | Норма         | 49,079±2,250  | 50,69±2,480          | 0,968±0,047                     | 100      | 1               |
|  | ЭТГ           | 46,990±2,246  | 51,29±2,470          | 0,916±0,046                     | 100      | 1               |
| Гель-фильтрация на сефадексе G-25            | Норма         | 48,005±2,200  | 36,88±1,630          | 1,302±0,065                     | 97,81    | 1,35            |
|  | ЭТГ           | 45,734±2,170  | 36,78±1,645          | 1,243±0,060                     | 97,33    | 1,36            |
| Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе | Норма         | 32,196±1,450  | 2,34±0,110           | 13,759 ±0,070                   | 65,60    | 14,21           |
|  | ЭТГ           | 29,398±1,440  | 2,13±0,105           | 13,802 ±0,070                   | 62,56    | 15,06           |
| Гель-хроматография на Тойоперл HW-65         | Норма         | 12,782±0,565  | 0,17±0,075           | 75,188 ±3,655                   | 26,04    | 77,67           |
|  | ЭТГ           | 12,902±0,555  | 0,17±0,080           | 75,89 ±3,670                    | 27,46    | 82,85           |

Таким образом, с помощью разработанной схемы очистки были получены очищенные в 77,7 и 82,9 раз ферментные препараты НАД-МДГ с удельной активностью 75,19±3,66 и 75,89±3,67 Е/мг белка из гепатоцитов крыс в норме и при ЭТГ соответственно. Выход составил 26,0% и 27,5% для фермента из нормальной и пораженной  $CCl_4$  печени. Высокий выход фермента свидетельствует о том, что используемая комбинация хроматографических методов позволяет выделить чистый ферментный препарат с относительно небольшими потерями.

Исследование чистоты полученного после гель-хроматографии на Тойоперл HW-65 ферментного препарата с помощью метода гель-электрофореза в ПААГ показало, что фермент как в норме, так и при патологии был получен в гомогенном состоянии (рис.1.).

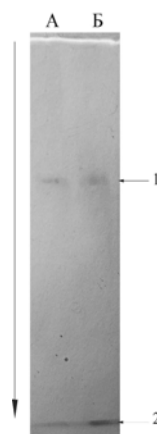


Рис.1. Электрофореграмма НАД-зависимой малатдегидрогеназы из печени крыс в норме (А) и при экспериментальном гепатите (Б) после проявления на белок: 1 – зона локализации фермента, 2 – фронт маркера (бромфеноловый синий); стрелкой показано направление движения белка при электрофорезе.

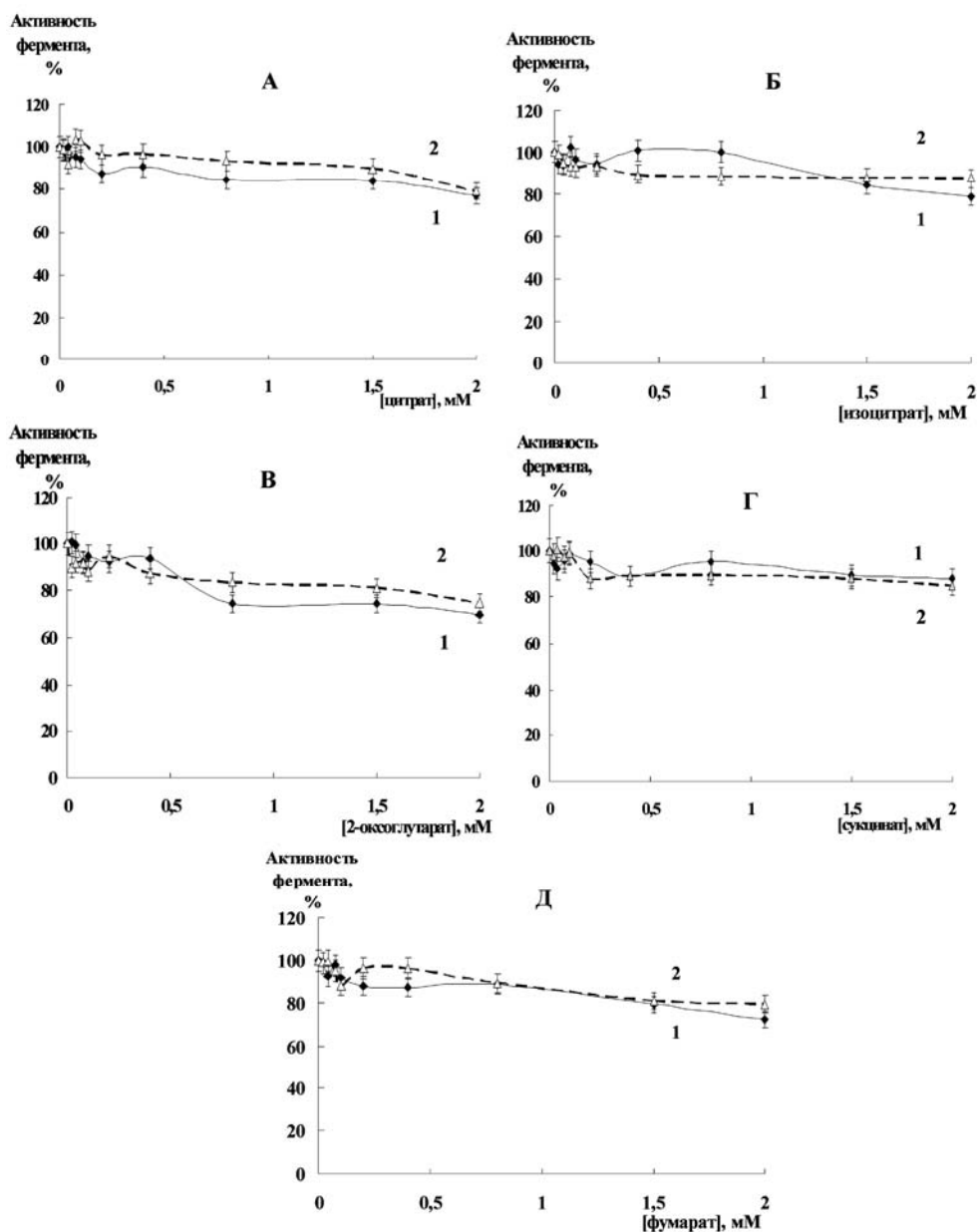


Рис. 2. Влияние цитрата (А), изоцитрата (Б), 2-оксоглутарата (В), сукцината (Г) и фумарата (Д) на активность НАД-малатдегидрогеназы из цитоплазмы печени контрольных животных (1) и крыс с токсическим гепатитом (2).

С использованием полученных гомогенных препаратов было проведено исследование влияния на активность НАД-МДГ таких клеточных метаболитов, как цитрат, изоцитрат, 2-оксоглутарат, сукцинат и фумарат. Согласно полученным результатам, данные соединения оказывают ингибирующее влияние на фермент как в норме, так и при ЭТГ. Так, цитрат в концентрации 2 мМ тормозит активность НАД-МДГ из печени контрольных животных и крыс опытной группы примерно на 20% (рис.2А). Изоцитрат также снижает активность НАД-МДГ, причем степень ингибирования для фермента в норме и при патологии различна. Так, при концентрациях 0,4-0,8 мМ для НАД-МДГ из гепатоцитов крыс с ЭТГ отмечено незначительное торможение активности; в норме же данный эффект не был выявлен. В то же время изоцитрат в концентрации 2 мМ снижает активность фермента в норме в большей степени, чем при патологии (рис.2Б). Показано, что 2-оксоглутарат

и фумарат в концентрациях выше 0,5 мМ и сукцинат в концентрациях выше 0,2 мМ также ингибируют исследуемый фермент как в норме, так и при ЭТГ (рис.2В, 2Г, 2Д).

Таким образом, при исследовании действия указанных интермедиатов на активность НАД-МДГ в большинстве случаев был выявлен незначительный ингибирующий эффект, причем достоверных различий между значениями в норме и при патологии печени отмечено не было. Согласно литературным данным, в регуляции активности МДГ в клетке могут участвовать многие низкомолекулярные соединения. Так, некоторые органические кислоты, представляющие собой субстраты-аналоги МДГ (малонат, фумарат, цитрат, цис-аконитат) могут являться конкурентными ингибиторами этого фермента [6]. Имеются сведения, что активность МДГ снижают сукцинат [5] и  $\alpha$ -кетоглутарат [15] и некоторые другие соединения.

### Заключение

Таким образом, с использованием разработанной схемы очистки фермента, включающей различные виды хроматографии, был получен высокоочищенный препарат цитоплазматической НАД-МДГ. Было выявлено сходство в регуляции активности фермента рядом внутриклеточных метаболитов в норме и при патологии. В то же время отмечены незначительные различия во влиянии изоцитрата на НАД-МДГ из контрольной и пораженной  $CCl_4$  печени.

### Список литературы

1. Андреешева Е.М., Попова Т.Н., Артюхов В.Г. Интенсивность свободнорадикального окисления и каталитические свойства NADP-изоцитратдегидрогеназы в печени крысы в норме и при токсическом гепатите // Биомедицинская химия. 2006. Т. 52, № 2. С. 153-160
2. Глотов Н.А., Шмелева Л.Т. Влияние гипоксии и глютаминовой кислоты на содержание кетокислот в миокарде и почках крыс // Укр. биохим. журн. 1973. № 5. С. 605-608.
3. Robinson B.H., Olei J. Citrate transport in guinea pig heart mitochondria // Biochem. 1975. V. 53, № 5. P. 643-64.
4. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3-х томах. М. Мир. 1985. 1056 с.
5. Косматых Т. А. Физикохимические и кинетические свойства изоформ малатдегидрогеназы из гепатоцитов голодающих крыс : дис. канд-та биол. наук : 030004 : защищена 29.11.02. Воронеж. 2002. 148 с.
6. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла. Воронеж. Центрально-черноземное книжное издательство. 2005. 224 с.
7. Иванищев В.В., Курганов Б.И. Ферменты метаболизма малата: характеристика, регуляция активности и биологическая роль // Биохимия. 1992 . Т. 57, № 5. С. 653-662.
8. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Л. Изд-во ЛГУ. 1982. 272 с.
9. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М. Высшая школа. 1980. 272с.

10. Cooper T.G., Beevers H. Mitochondria and glyoxisomes from castor been endosperm // J. Biol. Chem. 1969. V. 244, № 13. P. 3507-3513.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V.194, № 1. P.265-271.
12. Davis B.J., Jones R.G., Farmer G.R. Disk-electrophoresis. Method and application to human surum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404-427.
13. Shevchenko A., Wilm H., Vorm O. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide // Anal. Chem. 1996. V.68. P.850-858.
14. Ллойд Э., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М. Финансы и статистика. 1990. С. 493 – 513..
15. Hartl T. Die Malat-Dehydrogenase des Archebacteriums Sulfolobus acidocaldarius. Reinigung, kristallisation und Charakterisierung: diss. dokt. naturwis fak. chem. univ. Stuttgart, 1987. 169 p.

---

**Михайлова Елена Владимировна** - аспирант кафедры аналитической и медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский госуниверситет, биолого-почвенный факультет, Воронеж, тел. (4732)20-82-78 (р.);

**Сафонова Ольга Анатольевна** - к.б.н., ассистент, кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Воронежский госуниверситет г.Воронеж, тел. (4732) 20-82-78

**Попова Татьяна Николаевна** - д.б.н., проф., кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Воронежский госуниверситет, тел.: (4732) 20-82-78

**Mikhailova Elena V.** - post-graduate student, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: [mikhailova@bio.vsu.ru](mailto:mikhailova@bio.vsu.ru)

**Safonova Olga A.** - Cand.Biol.Sci., assistant Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University, Voronezh,

**Popova Tatyana N.** - Dr.Sci.Biol., professor, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University



УДК 544.726

## Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах

Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Багно О.П.,  
Трофимова О.Д., Беленова А.С.

*ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж*

*Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Воронеж*

### Аннотация

Химические методы иммобилизации ферментов в настоящее время являются доминирующим способом получения гетерогенных биокатализаторов. При подборе условий иммобилизации препарата выявлено, что наиболее предпочтительным носителем является анионообменная смола АВ-17-2П, отработавшая в условиях сахаро-рафинадного производства в течение 400 циклов, изменение физико-химических свойств которой обусловлено многократными процессами сорбции-десорбции меланоидинов и других продуктов щелочного распада инвертного сахара. Оптимальным методом иммобилизации является модифицированный глутаральдегидный способ ковалентного связывания фермента с носителем, заключающийся в процессе наращивания связывающего звена между липазой и анионитом при обработке рядом органических реагентов.

Показано, что в процессе ковалентной и адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы происходит многоточечное связывание как с крахмалосвязующим, так и с каталитическим доменом, что сопровождается увеличением  $K_m$ , уменьшением  $V_{max}$  и значительным снижением величины константы конформационного перехода ( $L_0$ ). Кинетика реакции гидролиза крахмала не соответствует уравнению Михаэлиса.

**Ключевые слова:** иммобилизация, фермент, анионит

A covalent immobilization of enzymes on anion-exchange resin AV-17-2P has been carried out by modified glutaraldehyde method, the essence of which is a consecutive treatment of anionite matrix by succinic anhydride, thionile chloride, ethylenediamine and incubation with a modified support.

It has been discovered that the effective connecting of the support with starch-binding and catalytic domains of glucoamylase occurs, an increase of  $K_m$  and a decrease of  $V_{max}$  and  $L_0$ . Kinetics of starch hydrolysis does not lead to changes of the curve form of rate dependence on substrate concentration.

### Введение

В последние годы при производстве различных видов продукции широко используются гидролитические ферменты микроорганизмов, характеризующиеся более высокой активностью и низкой себестоимостью по сравнению с энзимами растительного и животного происхождения. Выявление особенностей структуры и функционирования гидролаз становится особенно актуальным в связи с их биологической ролью, а также предоставляет новые возможности для создания



катализаторов с целью их дальнейшего эффективного применения в различных отраслях промышленности и в качестве медицинских препаратов [1, 2, 5].

Гидролитические ферментные препараты используют для заместительной терапии гипо- и дисферментозов желудочно-кишечного тракта, разрушения продуктов распада белков при ожогах, лечения гнойно-воспалительных заболеваний легких, для рассасывания тромбов кровеносных сосудов, а также при аномальном накоплении гликогена в клетках и тканях.

В настоящее время в лабораториях научно-исследовательских институтов разрабатывается новая прогрессивная технология – катализ с использованием иммобилизованных ферментов, имеющих ряд преимуществ перед растворимыми катализаторами в связи с более высокой стабильностью по отношению к денатурирующим факторам окружающей среды и возможностью пролонгированного действия медицинских препаратов, созданных на их основе. Особое значение при создании лекарственных препаратов на основе иммобилизованных гидролаз и промышленных биокатализаторов имеет подбор соответствующего носителя и способа иммобилизации [3, 4].

В этой связи целью нашей работы было исследование условий иммобилизации и физико-химических свойств иммобилизованных гидролитических ферментов.

### **Эксперимент.**

Объектом исследования служили следующие ферменты: липаза (триацилглицерол ацилгидролаза, КФ 3.1.1.3) из *Rhizopus japonicus* 1403, гидролизующая триглицериды до карбоновых кислот, и глюкоамилаза из *Aspergillus awamori* Г-20Х ( $\alpha$  -1,4:1,6-глюкан- 4,6 глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3), осуществляющая гидролиз полисахаридов до глюкозы путем разрыва гликозидных связей.

Культивирование штаммов *Rhizopus japonicus* 1403 и *Aspergillus awamori* Г-20Х осуществляли глубинным способом. Препарат глюкоамилазы получали путем ультрафильтрации на мембране УФМ – 50, осаждения изопропиловым спиртом и гель-хроматографии на сефадексах G-25 и G -100. Для выделения и очистки липазы использовали ацетон, ультрафильтрацию на мембране УАМ – 30, гель – фильтрацию на сефадексе G-150 и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ – целлюлозе. Гомогенность полученных ферментных препаратов подтверждена методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Каталитическую активность глюкоамилазы определяли глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов для измерения концентрации глюкозы в биологических жидкостях (OLVEX DIAGNOSTICUM); в качестве субстрата использовали крахмал.

Каталитическую активность липазы измеряли спектрофотометрическим методом, основанным на определении оптической плотности окрашенных продуктов взаимодействия основной формы цветного реагента родамина 6Ж в бензоле и карбоновых кислот (в данном случае – бутановой), освобождающихся в ходе гидролиза триглицеридов. Определение количества белка в препаратах гидролаз осуществляли методом Лоури, в иммобилизованных ферментах - модифицированным методом Лоури. Изучение процесса термической инактивации проводили инкубируя раствор фермента ( $5 \cdot 10^{-5}$  мол/л) в интервале времени 10-60

мин. при различных температурах с последующим определением каталитической активности.

Иммобилизацию гидролитических ферментов производили сорбционным и глутаральдегидным методами. В качестве носителя для иммобилизации применяли товарную ионообменную смолу АВ-17-2П, а также анионит, проработавший в сахаро-рафинадном производстве в течение года в качестве адсорбента красящих веществ. Подготовку носителей осуществляли путем кондиционирования [6]. Перед кондиционированием отмывали большим избытком раствора гидроксида натрия и соляной кислоты до обесцвечивания промывных вод.

### Обсуждение результатов

В ходе исследования физико-химических свойств полученных ферментных препаратов установлено, что оптимальными условиями функционирования глюкоамилазы плесневого происхождения являются:  $t = 40^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=4,7$ , концентрация субстрата  $1.16 \cdot 10^{-6}$  моль/л.

При иммобилизации глюкоамилазы в качестве носителя использовали анионит АВ-17-2П, используемый в сахаро-рафинадном производстве в течение 20 циклов (I), 400 циклов (II) и более года (III) (табл.1).

Таблица 1. Характеристики глюкоамилазы, иммобилизованной сорбционным методом на анионитах, используемых в производстве для очистки сахара

| Марка ионита   | Удельная активность, ед/мг | Активность иммобилизованного фермента, % от свободного | Процент сохранения активности иммобилизованного фермента, % |
|----------------|----------------------------|--|---|
| АВ-17-2П (I)   | $2029 \pm 0,5$             | 46   | 46,7  |
| АВ-17-2П (II)  | $2635 \pm 1$               | 60   | 60,7  |
| АВ-17-2П (III) | $586 \pm 1$                | 1,3  | 13,5  |

Примечание: активность свободной глюкоамилазы - 4340 ед/мг

При исследовании физико-химических свойств глюкоамилазы, иммобилизованной на анионите АВ-17-2П адсорбционным методом, показано, что гетерогенный катализатор проявляет максимальную каталитическую активность при температуре  $50^{\circ}\text{C}$  (рис.1),  $\text{pH} = 4.7$ .

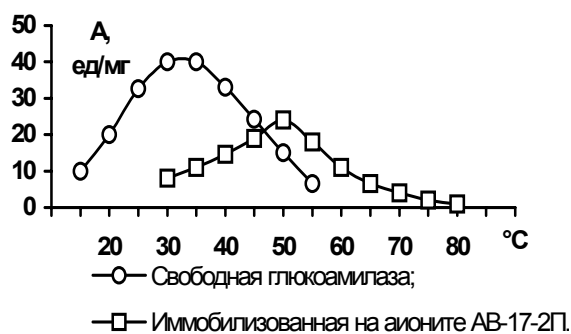


Рис. 1 Зависимость каталитической активности глюкоамилазы, иммобилизованной сорбционным методом, от температуры

Выявлено, что наибольшей активностью обладает фермент, связанный с ионитом АВ-17-2П, проработавшим в течение 400 циклов в производственных условиях.

В процессе эксплуатации АВ-17-2П в промышленной технологии анионит приобретает свойства амфолита, нарушается так же и степень сшивки. Эти изменения приводят к тому, что молекула сорбционно иммобилизованной глюкоамилазы оказывается в микроокружении, благоприятствующем проявлению ее каталитических свойств. Молекулы фермента могут проникать в более глубокие слои матрицы носителя, что и сопровождается увеличением внутридиффузионного торможения реакции гидролиза крахмала. Установлено, что удельная активность иммобилизованного фермента зависит от срока работы ионита в производственных условиях. При использовании анионообменника более года наблюдаются нарушения матрицы, поэтому количество связанного белка для образца АВ-17-2П(III) - 3,57 мг/л, что в 3 раза выше, чем для АВ-17-2П(II). Однако глюкоамилаза, иммобилизованная на АВ-17-2П(II), сохраняет 60% активности свободного фермента, а связанная с ионитом АВ-17-2П(III) - лишь 1,3%.

В работах Г.В. Самсонова и сотрудников показано, что аниониты сорбируют полипептиды за счет молекулярного взаимодействия (дисперсионного, ион-дипольного) [7]. В этой связи они используются при производстве сахара в качестве адсорбентов красящих веществ. При взаимодействии анионита с сахарным сиропом в процессе очистки образуются меланоидины, которые, попадая в фазу ионообменной смолы, претерпевают структурные изменения и вступают в реакции конденсации с функциональными группами ионообменника [8].

Очевидно, в процессе очистки сахарных сиропов происходит поглощение ионитом меланоидинов и других окрашенных компонентов сахаро-рафинадного производства, содержащих пептидные группы, и такая "модификация" способствует адсорбционной иммобилизации ферментов.

Химические методы иммобилизации ферментов в настоящее время являются доминирующим способом получения гетерогенных биокатализаторов. Модифицированный глутаральдегидный способ иммобилизации, заключающийся в попеременной обработке ионита янтарным ангидридом, хлористым тионилем, этилендиамином и глутаровым альдегидом, обеспечивает повышение активности иммобилизованной глюкоамилазы по сравнению с обычным глутаральдегидным методом в 2 раза. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что применение отработанного анионита АВ-17-2П способствовало увеличению количества связанного белка по сравнению с использованием товарной смолы в качестве носителя в 3 раза.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что для получения более активных и стабильных препаратов глюкоамилазы в качестве подложки необходимо использовать ионит АВ-17-2П, отработавший в условиях сахаро-рафинадного производства 400 циклов. Оптимальные режимы функционирования данного гетерогенного биокатализатора следующие:  $t = 55^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 4,7$ . При этом ферментный препарат сохраняет 46 % активности нативной глюкоамилазы.

Очевидно, в процессе ковалентной и адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы происходит многоточечное связывание как с крахмалсвязывающим, так и с каталитическими участками активного центра фермента, что сопровождается увеличением  $K_m$ , уменьшением  $V_{\max}$  и значительным снижением величины константы конформационного перехода. Установлено, что при связывании фермента с носителем кинетика реакции гидролиза крахмала не соответствует уравнению

Михаэлиса-Ментен, сопровождается сдвигом равновесия при переходе энзима из состояния R в состояние T.

Возрастающие масштабы использования липаз в фармацевтической и пищевой промышленности вызывают необходимость поиска эффективных продуцентов ферментов данной группы, в качестве, которого в настоящей работе служит микробиот Rhizopus japonicus 1403. Для решения проблем регулирования биологических свойств липазы необходимо детальное исследование физико-химических, кинетико-термодинамических свойств фермента, особенностей его структурной организации, раскрытие молекулярного механизма реакции превращения субстрата.

Показано, что оптимальными условиями ферментативного гидролиза триглицеридов являются:  $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,5$ ; концентрация субстрата  $1,75 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

При подборе условий иммобилизации препарата липазы из Rhizopus japonicus 1403 выявлено, что наиболее предпочтительным носителем является анионообменная смола АВ-17-2П, отработавшая в условиях сахаро-рафинадного производства в течение 400 циклов, изменение физико-химических свойств которой обусловлено многократными процессами сорбции-десорбции меланоидинов и других продуктов щелочного распада инвертного сахара. Оптимальным методом иммобилизации является модифицированный глутаральдегидный способ ковалентного связывания фермента с носителем, заключающийся в процессе наращивания связывающего звена между липазой и анионитом при обработке рядом органических реагентов.

Установлено, что иммобилизованный препарат липазы сохраняет 23% активности по сравнению с растворимой формой фермента. Оптимальная температура реакции гидролиза триглицеридов при иммобилизации повышается на  $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , оптимум pH смещается вправо на 0,5 единиц, значения  $K_m$  и  $V_{\text{max}}$  увеличиваются на 52% и 49% соответственно (рис. 2, 3).

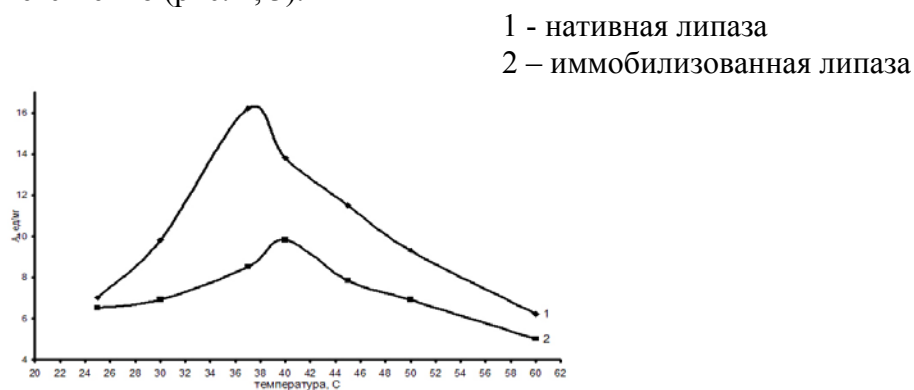


Рис.2 Зависимость каталитической активности нативной и иммобилизованной липазы от температуры

Иммобилизация липазы приводит к увеличению  $E_{\text{акт}}$  и энтальпии активации реакции гидролиза, что связано с затруднением процесса перехода иммобилизованного фермента в «открытую» конформацию на границе раздела фаз «липид-вода».

Отрицательные значения  $\Delta S$  для реакции гидролиза, осуществляемого свободной и иммобилизованной липазой, позволяют заключить, что расщепление

эфирных связей трибутирина протекает с большой скоростью и характеризуется высокой упорядоченностью.

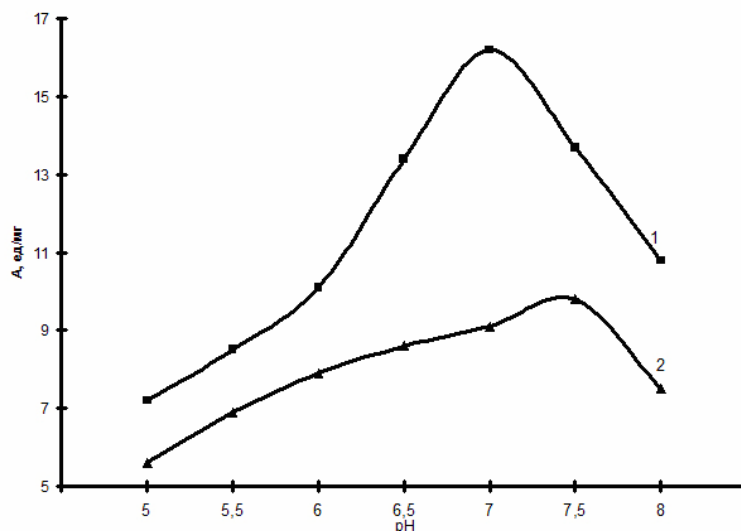


Рис.3 Зависимость каталитической активности нативной и иммобилизованной липазы от значения pH

Незначительное увеличение абсолютного значения  $\Delta S_{\text{акт}}$ , наблюдаемое при иммобилизации липазы, свидетельствует, вероятно, о более направленном взаимодействии фермента с субстратом.

Таблица 2. Значения кинетико-термодинамических параметров реакции гидролиза трибутирина, катализируемой свободной и иммобилизованной на АВ-17-2П липазой

| Фермент                 | $K_m$ , ммоль/л | $V_{\text{max}}$ , ммоль/мин | $E_{\text{акт}}$ , кДж/моль | $\Delta H$ , кДж/моль | $\Delta S$ , кДж/моль.К |
|-------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Свободная липаза        | 3,22            | 71,42                        | 23,54                       | 2,62                  | -8,39                   |
| Иммобилизованная липаза | 1,56            | 37,04                        | 30,70                       | 4,01                  | -8,56                   |

### Заключение

Таким образом, с целью удешевления целевого продукта и утилизации отходов пищевой промышленности в качестве носителя для иммобилизации гидролитических ферментов целесообразно применение отработанного в сахарорафинадном производстве анионита АВ-17 – 2П.

Экологическая безопасность анионита и его относительно низкая себестоимость позволяют рекомендовать полученные на его основе препараты иммобилизованных ферментов для использования в ряде отраслей легкой, пищевой, химической промышленности, медицине. Разработанный модифицированный способ глутаральдегидного метода иммобилизации, заключающийся в наращивании промежуточного звена («вставки», «ножки») на носителе, обеспечивает повышение активности иммобилизованного фермента по сравнению с обычным глутаральдегидным способом в 2 раза и позволяет сохранить мобильность третичной структуры, необходимую для гидролиза полимерного субстрата.

## Список литературы

1. Давранов К.Д. Современное состояние исследования микробных липаз / К.Д. Давранов, В.Б. Халамейзер // Химия природ. соед. – 1997. – №2. – С. 150-169.
2. Диксон М. Ферменты / М. Диксон. – М. : Мир, 1966. – Т.1. – 396 с.
3. Аре Р.Ю. Очистка, физико-химические и каталитические свойства микробных липаз / Р.Ю. Аре, Б.Я. Лусина, М.Г. Плата // Изд. АН Латвийской ССР. – 1979. – №6. – С. 93–106.
4. Березин И.В. Структура и функции активных центров ферментов / И.В. Березин, К. Мартинек. – М. : Наука, 1974. – 238 с.
5. Олигомерные белки: структурно – функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В.Г. Артюхов [и др.]. – Воронеж : Изд-во Воронежского государственного ун-та, 1997. – 264 с.
6. Капранчиков В.С. Некоторые физико-химические свойства липазы зародышей семян пшеницы / И.С. Капранчиков, Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова // Биотехнология. – 2003. – №5. – С. 44-52.
7. Компьютерный анализ пространственной структуры некоторых гидролитических ферментов / В.Г. Артюхов [и др.]. // Биохимия. – 2005. – Т.70, №10. – С. 1318-1327.
8. Дужак А.Б. Выделение и свойства препаратов внеклеточных липаз природного (В-10) и мутантного (М-1) штаммов *Serratia marcescens* / А.Б. Дужак, З.И. Панфилова, Е.А. Васюнина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т.36, №4. – С. 402–411

---

**Ковалева Тамара Андреевна** - профессор кафедры биофизики и биотехнологии, доктор биологических наук Воронежского государственного университета, тел. 8(4732)208586

**Kovaleva Tamara A.** - professor of biophysics and biotechnology department, doctor of biological science, Voronezh State University, e-mail: [Tamara\\_kovaleva@inbox.ru](mailto:Tamara_kovaleva@inbox.ru)

**Беленова Алена Сергеевна** - аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, тел. 8(4732)593152

**Belenova Alena S.** - postgraduate (student) of biophysics and biotechnology department, Voronezh State University e-mail: [Alenca198322@mail.ru](mailto:Alenca198322@mail.ru)

**Кожокина Оксана Михайловна** - ассистент кафедры биохимии, кандидат биологических наук Воронежской государственной медицинской академии им. Бурденко

**Kozhokina Oksana M.** - assistant of biochemistry department, Voronezh N.N.Burdenko State Medical Academy, e-mail: [Tamara\\_kovaleva@inbox.ru](mailto:Tamara_kovaleva@inbox.ru)

**Трофимова Ольга Дмитриевна** – к.б.н., ассистент Воронежский государственный университет

**Trophimova Olga D.** - assistant of biochemistry department, Voronezh State University, e-mail: [Pfi.pharm@mail.ru](mailto:Pfi.pharm@mail.ru)

**Багно Ольга Петровна** – аспирант Воронежского государственного университета

**Bagno Olga P.** - post-graduate Voronezh State University, e-mail: [ole200381@mail.ru](mailto:ole200381@mail.ru)



УДК 543.862.2

## Идентификация и определение ароматобразующих компонентов истинного раствора молока

Коренман Я.И., Мельникова Е.И., Нифталиев С.И.,  
Рудниченко Е.С., Ширунов М.О.

*Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж*

### Аннотация

Для определения легколетучих компонентов газовой фазы истинного раствора молока применены методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и пьезокварцевого микровзвешивания.

Изучены количественные параметры газовой сорбции некоторых кислот, спиртов и эфиров на 12 сорбентах, оптимизированы условия сорбции.

**Ключевые слова:** идентификация, определение, сорбция, сорбент, ВЭЖХ, истинный раствор молока

The HPLC and piezoquartz microweighing were applied to for the definition of individual molecular solution of whey gas phase components.

The quantitative gas sorption parameters of some acids, ketones and ethers were determined on 12 sorbents covers of different kinds.

Kinetics of individual components sorbtion was studied; a lot of sorbent covers on piezosensors resonator electrodes were optimized.

**Key words:** identification, determination, sorption, high-performance liquid chromatography molecular solution

### Введение

Перспективное направление в производстве пищевых продуктов связано с применением истинного раствора молока – продукта ультрафильтрационного фракционирования творожной сыворотки, который является ценным сырьем благодаря своему составу и свойствам (табл. 1). Он содержит значительное количество лактозы (3,5 – 3,7 %), а также аминокислоты, низкомолекулярные биологически активные белковые вещества, молочную кислоту, различные макро- и микроэлементы, жиро- и водорастворимые витамины. По органолептическим показателям истинный раствор молока – однородная прозрачная с оттенком желтоватого цвета жидкость с высокой биологической и коллоидной стабильностью, может служить основой для выработки безалкогольных и алкогольных напитков.

В этой связи актуальность приобретает идентификация и количественное определение ароматобразующих компонентов истинного раствора молока. Запах и вкус всех молочных продуктов обуславливают различные группы химических

соединений, образующихся в результате превращений углеводов, аминокислот и жира молока при технологической обработке и хранении [2] (табл. 2).

Таблица 1. Физико-химические показатели истинного раствора молока [1]

| Показатель                   | Значение    |
|------------------------------|-------------|
| Вода, %                      | 94,6 – 94,9 |
| Сухие вещества, %            | 5,1 – 5,4   |
| в том числе:                 |             |
| лактоза                      | 3,5 – 3,7   |
| белковые вещества            | 0,1 – 0,2   |
| молочная кислота             | 1,0         |
| зола                         | 0,38        |
| Титруемая кислотность, °Т    | 75 – 85     |
| Активная кислотность, рН     | 2,4 – 6,5   |
| Плотность, кг/м <sup>3</sup> | 1017 – 1018 |

Таблица 2. Ароматобразующие компоненты истинного раствора молока

| Класс соединений     | Количество соединений | Состав   |
|----------------------|-----------------------|--|
| Кислоты              | 43                    | Муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, капроновая, каприловая, каприновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, янтарная, яблочная, лимонная, молочная                                     |
| Альдегиды            | 33                    | Формальдегид, ацетальдегид, пропионовый, масляный, изомасляный, валериановый, изовалериановый, капроновый, каприловый, кротоновый, бензойный, фенилуксусный, фурфурол, гептаналь, октаналь, нонаналь |
| Кетоны               | 28                    | Ацетон, винилпентилкетон, ацетоин, диацетил, бутанон-2, пентанон-2, гексанон-2, гептанон-2, октанон-2  |
| Лактоны              | 28                    | Насыщенные и ненасыщенные δ- и γ- лактоны алифатических кислот   |
| Эфиры                | 22                    | Эфиры этилового спирта, уксусной, масляной, капроновой и пировиноградной кислот  |
| Спирты               | 16                    | Этиловый, пропиловый, бутиловый, изопентиловый   |
| Сернистые соединения | 14                    | Сероводород, метиональ, метилмеркаптан, меркаптоацетальдегид, диметилсульфид, диметилдисульфид, меркаптопропионовая кислота  |
| Терпены              | 8                     | Гераниол, фес, ионон, линалоол, метилионон   |

## Эксперимент

Ароматобразующие вещества истинного раствора молока идентифицировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Условия



хроматографирования: колонка 300x7.8мм; защитная колонка Carbo-H+4x3.0мм; режим разделения – изократический; подвижная фаза – серная кислота (0,0025 М); расход 0.6 мл/мин; температура колонки 60 °С; объем пробы 20 мкл.

Сенсорометрический анализ равновесных газовых фаз легколетучих ароматобразующих веществ проводили в статическом режиме с применением моносенсорной ячейки детектирования вместимостью 50 см<sup>3</sup> с полиуретановой мембраной для инъекторного ввода пробы. Ячейка изготовлена из стекла в виде цилиндрического сосуда с герметически закрывающейся крышкой. Корпус ячейки снабжен тремя патрубками, один из которых предназначен для ввода анализируемой пробы, второй – для ввода газа-носителя (для регенерации сорбента применяли очищенный лабораторный воздух), третий – для вывода газа-носителя. Конструкция моносенсорной ячейки предусматривает жесткое крепление пьезокварцевого резонатора.

### Обсуждение результатов

Получены хроматограммы истинного раствора молока (рис. 1).

Количественные определения выполняли методом нормировки (табл. 3 и 4).

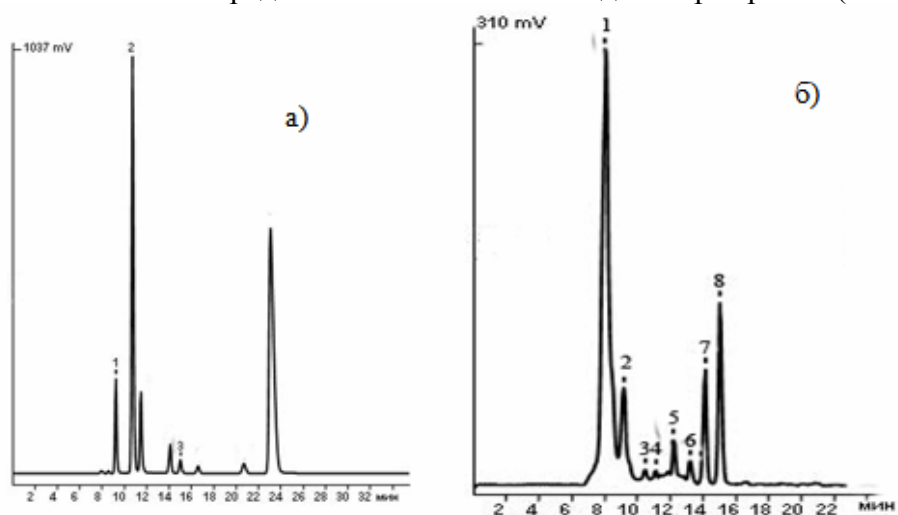


Рис. 1 Хроматограмма истинного раствора молока:

- а) 1 – уксусная кислота; 2 – масляная кислота; 3 – молочная кислота.  
 б) 1 – этиловый спирт; 2 – формальдегид; 3 – ацетальдегид; 4 – метилацетат;  
 5 – диацетил; 6 – ацетоин; 7 – этилацетат; 8 – этилаль

Таблица 3. Количественное определение уксусной, масляной и молочной кислот

| Кислота  | Время удерживания, мин·с | Площадь пика на хроматограмме $S_{п, мВ·с}$ | Высота пика на хроматограмме $h, мВ$ | Концентрация, с, % мас. |
|----------|--------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------|
| Уксусная | 9 – 50                   | 2735  | 228                                  | 18,2                    |
| Масляная | 11 – 32                  | 11760                                       | 981                                  | 78,2                    |
| Молочная | 14 – 55                  | 547   | 23                                   | 3,6                     |
| $\Sigma$ | –                        | 15042                                       | 1232                                 | 100                     |

Таблица 4. Количественное определение ароматобразующих компонентов истинного раствора молока

| Компонент      | Время удерживания, мин·с | Площадь пика на хроматограмме $S_{п}$ , мВ·с | Высота пика на хроматограмме $h$ , мВ | Концентрация, с, % мас. |
|----------------|--------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------|
| Этиловый спирт | 8 – 31                   | 6461   | 269                                   | 48,9                    |
| Формальдегид   | 9 – 18                   | 1078   | 645                                   | 8,2                     |
| Ацетальдегид   | 10 – 48                  | 49   | 4                                     | 0,4                     |
| Метилацетат    | 11 – 16                  | 49   | 4                                     | 0,4                     |
| Диацетил       | 12 – 07                  | 588  | 25                                    | 4,4                     |
| Ацетоин        | 13 – 44                  | 293  | 12                                    | 2,2                     |
| Этилацетат     | 14 – 11                  | 1762   | 73                                    | 13,3                    |
| Этилаль        | 15 – 13                  | 2938   | 122                                   | 22,2                    |
| $\Sigma$       | –                        | 13218  | 1154                                  | 100                     |

Пьезокварцевые резонаторы АТ-среза (колебания типа «сдвиг по толщине») [4] с собственной частотой колебаний 8–10 МГц модифицировали нанесением растворов сорбентов на электроды. Растворители сорбентов – этиловый спирт, ацетон, толуол и вода. Массу пленки модификатора рассчитывали по уравнению Зауэрбрея [5]

$$m_{nl} = \frac{\Delta F_{nl} S}{K_f F_0^2}, \quad (1)$$

где  $\Delta F_{nl}$  ( $F_0 - F_{nl}$ ) – изменение частоты колебаний пьезорезонатора при формировании пленки, Гц;  $F_0$  – собственная частота колебаний кварца, Гц;  $F_{nl}$  – частота колебаний кварца, модифицированного пленкой сорбента, Гц;  $K_f$  – градуировочная константа пьезоэлектрических микровесов (при н.у.  $K_f = -2,3 \cdot 10^{-6} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ );  $S$  – площадь электродов резонатора ( $0,2 \text{ см}^2$ ).

Масса модификатора относится к параметрам, влияющим на чувствительность пьезосенсора. Оптимальные массы модификаторов, обеспечивающие значимый аналитический сигнал и минимальную погрешность определения, составляют 10 – 20 мкг. Увеличение или уменьшение массы пленок снижает сорбционную емкость модификаторов и чувствительность микровзвешивания.

Модификаторы электродов – рибонуклеиновая кислота,  $\beta$ -нафтол, фосфорно-молибденовая кислота, нитропруссид натрия, дифенилкарбазид, трис-оксиметил-аминометан, N-метил-2-пироллидин, сульфосалициловая кислота, полиэтиленгликоль сукцинат (ПЭГС), полиэтиленгликоль фталат (ПЭГФ), полифениловый эфир, полистирол.

В стеклянный бюкс предварительно помещали ароматобразующий компонент истинного раствора молока, выдерживали в течение 5 мин и отбирали шприцем вместимостью  $10 \text{ см}^3$  равновесную газовую фазу ароматобразующего компонента истинного раствора молока.

Перед измерениями модифицированный пьезокварцевый резонатор 15 – 30 мин адаптировали к среде ячейки детектирования. Показатель стабилизации сенсора – сдвиг частоты колебаний в течение 5 мин, не превышающий 10 – 15 Гц. Затем в ячейку детектирования шприцем вводили определенный объем равновесной газовой фазы ароматобразующего компонента истинного раствора молока. Сигналы

считывали каждые 5 с до установления равновесия в сорбционной системе. Ячейку и тонкую пленку модификатора регенерировали продувкой воздухом.

При сорбции изменяется масса модификатора, следовательно, и частота колебаний сенсора (абсолютный отклик  $F_c$ ). Изменение частоты колебаний сенсора во времени ( $\Delta F_c = F_{пл} - F_c$ ) фиксировали в виде выходной кривой сорбции  $\Delta F_c = f(\tau)$  (рис. 2).

Эффективность сорбции оценивали в идентичных условиях (20 °С) по величине аналитического сигнала  $\Delta F_c$ , Гц (максимальное изменение частоты колебания сенсора при сорбции). Сорбционную емкость резонатора ( $a$ ) рассчитывали как отношение максимального изменения частоты колебания сенсора при сорбции к изменению частоты колебаний при формировании пленки [6]. Кинетический параметр процесса – время полной сорбции ( $\tau$ , с). Полученные количественные характеристики сорбции приведены в табл. 5.

Наиболее емкими по отношению к парам масляной и уксусной кислот, а также этилацетату и этиловому спирту являются ПЭГС, ПЭГФ, трис-оксиметиламинометан, N-метил-2-пироллидин. С применением этих сорбентов достигается максимальный аналитический сигнал при экспонировании в парах определяемых компонентов истинного раствора молока. Высокая сорбционная емкость обеспечивает многократное применение сенсоров без изменения чувствительности.

Для всех изученных сорбентов получены кинетические кривые сорбции. В качестве примера приведем выходные кривые сорбции паров масляной и уксусной кислот, этилацетата, этиловый спирт (рис. 2).

Таблица 5. Количественные параметры сорбции

| Сорбент                       | Масса пленки, мкг | Уксусная кислота  |                  |            | Этилацетат        |                  |            | Этиловый спирт    |                  |            |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------|-------------------|------------------|------------|-------------------|------------------|------------|
|                               |                   | $\Delta F_c$ , Гц | $a^* \cdot 10^3$ | $\tau$ , с | $\Delta F_c$ , Гц | $a^* \cdot 10^3$ | $\tau$ , с | $\Delta F_c$ , Гц | $a^* \cdot 10^3$ | $\tau$ , с |
| Трис-оксиметил-аминометан     | 9,20              | 488               | 53,2             | 10         | 3                 | 0,3              | 5          | 7                 | 0,8              | 70         |
| Нитропруссид натрия           | 9,50              | 49                | 5,1              | 5          | 13                | 1,4              | 100        | 0                 | 0                | 0          |
| Фосфорно-молибденовая Кислота | 9,80              | 12                | 1,3              | 5          | 1                 | 0,1              | 5          | 0                 | 0                | 0          |
| Сульфосалициловая Кислота     | 9,89              | 13                | 1,4              | 5          | 3                 | 0,3              | 5          | 1                 | 0,1              | 5          |
| N-Метил-2-пироллидин          | 10,01             | 49                | 6,1              | 10         | 6                 | 0,8              | 5          | 6                 | 0,8              | 10         |
| $\beta$ -Нафтол               | 10,29             | 27                | 3,0              | 5          | 2                 | 0,2              | 10         | 0                 | 0                | 0          |
| Полифениловый Эфир            | 11,27             | 87                | 8,0              | 5          | 21                | 1,9              | 5          | 3                 | 0,3              | 5          |
| Полистирол                    | 11,56             | 7                 | 1,9              | 10         | 1                 | 0,3              | 5          | 2                 | 0,6              | 20         |
| Рибонуклеиновая Кислота       | 12,57             | 19                | 1,5              | 5          | 1                 | 0,1              | 5          | 1                 | 0,1              | 5          |
| Полиэтиленгликольсукцинат     | 12,61             | 111               | 9,4              | 10         | 4                 | 0,3              | 10         | 7                 | 0,6              | 35         |
| Дифенилкарбазид               | 12,96             | 15                | 1,8              | 5          | 3                 | 0,4              | 5          | 2                 | 0,2              | 5          |
| Полидиэтиленгликольфталат     | 13,55             | 149               | 12,4             | 10         | 5                 | 0,4              | 25         | 9                 | 0,7              | 40         |

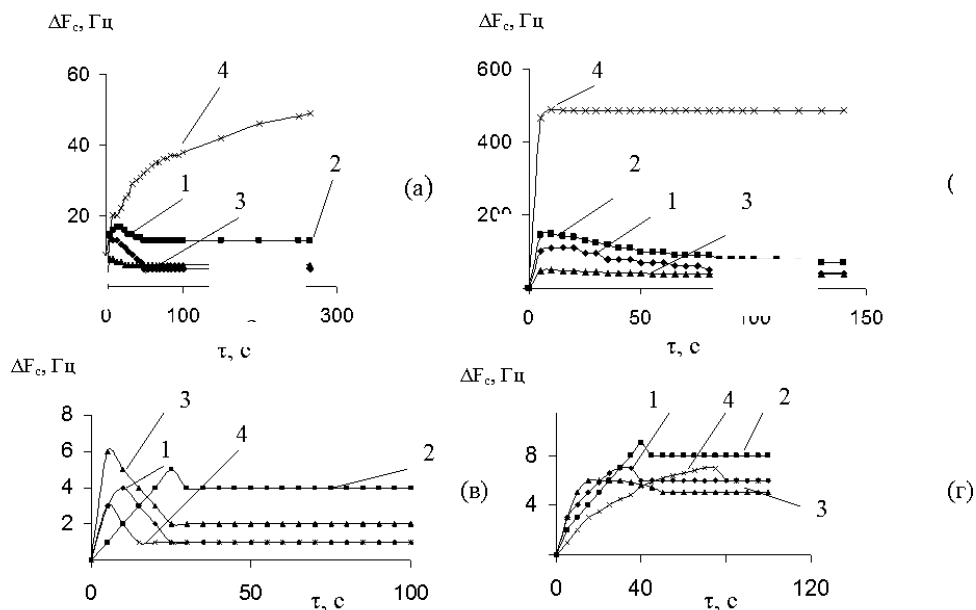


Рис. 2. Кинетические кривые сорбции паров масляной (а) и уксусной (б) кислот, этилацетата (в) и этилового спирта (г) на ПЭГС (1), ПЭГФ (2), N-метил-2-пирролидине (3), трис-оксиметиламинометане (4)

## Заключение

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено, что в состав равновесной газовой фазы истинного раствора молока входят вещества различной природы: кислоты, в том числе легколетучие (масляная, уксусная, молочная) [3], альдегиды (формальдегид, ацетальдегид, этилальдегид), кетоны (ацетоин, диацетил), эфиры (метилацетат, этилацетат), этиловый спирт (рис. 1), количественные характеристики приведены в табл. 3 и 4. Низшие алифатические кетоны и дикарбонильные соединения – резко пахнущие жидкости. В небольших концентрациях ацетоин и диацетил характеризуются приятными запахами, являются важными компонентами аромата. Карбоновые кислоты в значительных количествах придают кормовой, сырный и прогорклый запахи, этиловый спирт – характерный алкогольный запах [1].

Оптимизированы условия анализа методом пьезокварцевого микровзвешивания. Установлено, что при массе модификатора 10 – 20 мкг и объеме вводимой пробы 3 – 5 см<sup>3</sup> погрешность определения компонентов газовой фазы истинного раствора молока минимальна.

## Список литературы

1. Храмов А.Г. Безотходная технология в молочной промышленности.– М.: Агропромиздат, 1989.
2. Шидловская В.П. Органолептические свойства молока и молочных продуктов: Справочник. – М.: Колосс. 2002.
3. Коренман Я.И., Мельникова Е.И., Нифталиев С.И., Светолунова С.Е. Определение летучих жирных кислот в творожной сыворотке // Молочная промышленность. – 2005. – № 12.

4. Малов В.В. Пьезорезонансные датчики. – М.: Энергоатомиздат. 1989.
5. Кучменко Т.А. Применение метода пьезокварцевого микровзвешивания в аналитической химии. – Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад. 2001.
6. Коренман Я.И., Кучменко Т.А. Подходы к анализу пищевых продуктов // Разработка масс-чувствительных сенсоров // Рос. хим. журн. 2002. Т. 46, № 4.

---

**Коренман Яков Израильевич** - д.х.н., профессор кафедры аналитической химии Воронежской государственной технологической академии; тел. (4732) 55-07-62

**Korenman Ya.I.** - Dr.Sci.Chem, professor of Analytical Chemistry Department, Voronezh State Technological Academy, [korenman@vgta.vrn.ru](mailto:korenman@vgta.vrn.ru)

**Нифталиев Сабухи Илич** - д.х.н., профессор, заведующий кафедрой общей и неорганической химии Воронежской государственной технологической академии

**Niftaliev S.I.** - Dr.Sci.Chem, professor of General and Inorganic Chemistry Department, Voronezh State Technological Academy

**Мельникова Елена Ивановна** - д.т.н., профессор кафедры технологии молока и молочных продуктов Воронежской государственной технологической академии

**Mel'nikova E.I.** - Dr.Sci.Tech., Milk and Dairy products Technology Department, Voronezh State Technological Academy

**Рудниченко Елена Сергеевна** - аспирант кафедры аналитической химии Воронежской государственной технологической академии.

**Rudnichenko E.S.** - post-graduate student of Analytical Chemistry Department, Voronezh State Technological Academy.

**Ширунов Максим Олегович** - студент Воронежской государственной технологической академии

**Shirunov M. O.** - student of Voronezh State Technological Academy



УДК 543

## Динамика показателей компьютерной статической периметрии при абсорбции бринзоламида и травопроста в конъюнктивальной полости

Подопригора В. С., Львович Я. Е.

*Воронежский государственный технический университет, Воронеж*

### Аннотация

Инстилляцией офтальмологических препаратов создает в конъюнктивальной полости условия для абсорбции фармакологических агентов через роговицу и слизистую глазного яблока. Сила терапевтического воздействия медикаментозного средства зависит от нескольких причин, в том числе от абсорбционной способности действующего вещества. В работе приведены результаты сравнительного анализа эффективности гипотензивных препаратов на основе динамики показателей компьютерной статической периметрии.

**Ключевые слова:** локальная абсорбция, компьютерная статическая периметрия, ингибиторы карбоангидразы.

Instillation of eyedrops creates in a conjunctival cavity terms for absorption of pharmacological agents through a cornea and mucous membrane of eyeball. Effect of therapeutic influence of medicinal mean depends on a few reasons, including from absorbing ability of operating matter. In work the results of comparative analysis of efficiency of hypotensive preparations are resulted on the basis of dynamics of indexes of computer static perimetry.

**Key words:** local absorbtion, computer statistic perimetry, ingibitor of carboangidraze

### Введение

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – одна из наиболее частых причин необратимой слепоты. Следует отметить, что частота слепоты от глаукомы в мире за последние 30 лет практически не изменилась и составляет 14–15% от общего числа всех слепых [1]. Ведущим патогенетическим фактором, вызывающим повреждение зрительного нерва и ухудшение зрительных функций, является повышение офтальмотонуса. Своевременная и адекватная гипотензивная терапия ПОУГ позволяет в большинстве случаев избежать инвалидности и сохранить высокие зрительные функции пациента. В то же время, по данным литературы, у 27–33% больных, страдающих глаукомой и офтальмогипертензией и получающих монотерапию гипотензивными средствами, была выявлена необходимость назначения дополнительных гипотензивных препаратов для нормализации внутриглазного давления (ВГД) [2].

Целью данной работы было сравнительное исследование динамики офтальмотонуса и зрительных функций у пациентов с подозрением на глаукому при локальной абсорбции бринзоламида и травопроста.

## Эксперимент

Гамма используемых фармакологических агентов включает разнообразные препараты с различным механизмом гипотензивного действия. Медикаментозные средства условно можно разделить на группы по преимущественному воздействию на отток внутриглазной жидкости или на ее продукцию.

Ингибиторы карбоангидразы (ИКА) играют важную роль в секреции водянистой влаги. Лекарственный эффект ИКА связан с избирательной способностью угнетать активность карбоангидразы – фермента, участвующего в процессе гидратации и дегидратации угольной кислоты. Карбоангидраза катализирует превращение карбоксида в угольную кислоту ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3$ ). Угольная кислота впоследствии диссоциирует ( $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ). Эта реакция – ключ к секреторным физиологическим процессам во многих тканях, в том числе и в глазу [6]. В настоящее время для больных доступна 1% офтальмологическая суспензия бринзоламида. Химическое название - (4R)-4-(Этиламино)-3,4-дигидро-2-(3-метоксипропил)-2H-тиено[3,2-е]-1,2-тиазин-6-сульфонамид-1,1-диоксид [3,5]. Местные ИКА, специфически подавляя карбоангидразу II цилиарного тела, не оказывают других значимых фармакологических эффектов. Это объясняется тем, что терапевтическая доза и низкая системная абсорбционная способность этих препаратов не позволяют достичь уровня для системного угнетения КА. Низкий период их полувыведения из цилиарного тела обеспечивает пролонгированный гипотензивный эффект [6].

Из медикаментозных средств улучшающих отток внутриглазной жидкости аналоги простагландинов на сегодняшний день являются наиболее перспективным и разрабатываемым классом лекарственных препаратов.

По химическому строению простагландины (ПГ) представляют собой 20-ти углеродные жирные кислоты, содержащие 5-ти углеродное лактонное кольцо. Источником для образования ПГ являются ненасыщенные жирные кислоты (НЖК), которые поступают в организм с пищей и в фосфорилированном виде входят в структуру мембран клеток. При повреждении клеточных мембран или в физиологических условиях под действием катехоламинов, брадикинина, ангиотензина 2, активирующих фосфолипазу A2, происходит стимуляция образования арахидоновой кислоты из НЖК. Затем под действием циклооксигеназы образуются нестабильные ПГ. В дальнейшем, в результате воздействия антиокислительных систем клеток, кислород соединяется с водородом с образованием гидроксильных в кольце и боковых цепях и формируется молекула стабильных ПГ.

Травопрост 0,004% — синтетический простагландин F 2 $\alpha$ , обладающий высокой селективностью по отношению к FP-рецепторам. Химическое название - изопропил - (2) - 7 - [(1R, 2R, 3R, 5S) - 3, 5 - дигидрокси - 2 - [(1E, 3R) - 3 - гидрокси - 4 - [(альфа, альфа, альфа - трифтор - m - толил) окси] - 1 - бутенил] циклопентил] - 5 - гептаноат [4]. Травопрост является липофильным пролекарством, преобразующимся в активную кислоту после абсорбции через роговицу. Кислота травопроста взаимодействует с рецепторами цилиарной мышцы, клеток трабекулярной сети, вызывая разрушение экстрацеллюлярного матрикса и активируя увеосклеральный путь оттока [4].

Были обследованы 79 пациентов с подозрением на ПОУГ (158 глаз) в возрасте 62±5,6 лет. Проведение стандартного комплексного офтальмологического обследования на глаукому оказалось недостаточно для постановки диагноза. Исходя из этого, нами был разработан способ проведения разгрузочной пробы с

использованием местных гипотензивных препаратов на основе сравнительной оценки результата компьютерной статической периметрии (КСП). В зависимости от используемого при постановке разгрузочной пробы фармакологического агента пациенты были разделены на две группы:

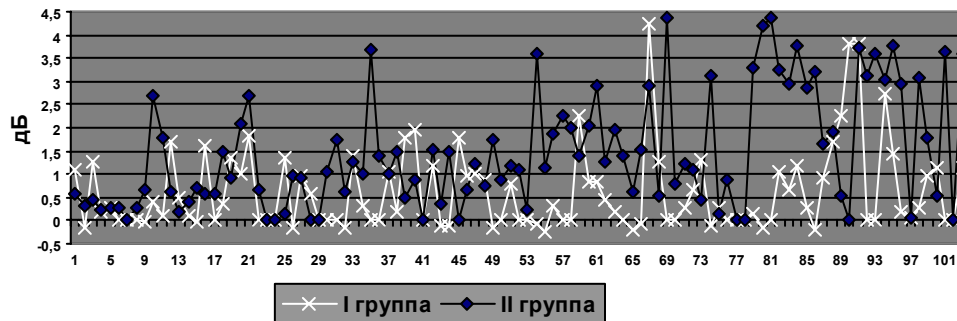
группа I – инстилляцией ингибитора карбоангидразы – 1% офтальмологическая суспензия;

группа II – инстилляцией синтетического аналога простагландина F-2 $\alpha$  - 0,004% раствор травопроста.

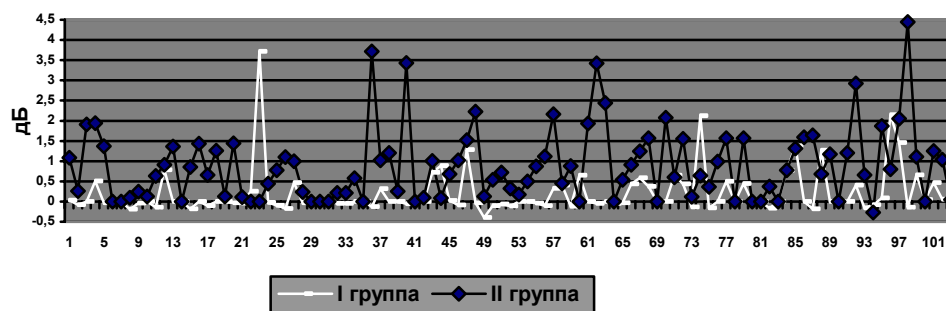
Определение уровня ВГД проводилось по стандартной методике с помощью тонометра Маклакова. Порог чувствительности определялся стандартным шаблоном системного теста на глаукому по 104 точкам, на автоматизированном периметре «Medmont M700» фирмы «Medmont Pty Ltd» (Австралия). Все исследования были выполнены до местного применения препарата. Контрольные показатели регистрировали с учетом времени абсорбции и достижения максимального гипотензивного эффекта фармакологических агентов.

### Обсуждение результатов

После инстилляций гипотензивных препаратов регистрировалась положительная динамика, определяемая снижением уровня внутриглазного давления. Так, в I группе пациентов с подтвержденным по данным комплексного исследования диагнозом первичная открытоугольная глаукома понижение офтальмотонуса составило 2 мм рт. ст., а для аналогичной подгруппы пациентов получавших местно раствор травопроста – этот показатель составил 4 мм рт. ст.



а



б

Рис. 1. Динамика показателей КСП у пациентов I и II групп с подтвержденным диагнозом ПОУГ: А- справа; Б - слева



При анализе показателей КСП пациентов с подтвержденным по данным комплексного исследования диагнозом ПОУГ была выявлена положительная динамика в виде уменьшения депрессии чувствительности по площади и интенсивности. Были вычислены значения разностей ( $\Delta$ ) между контрольным значением порога чувствительности сетчатки после применения местного гипотензивного препарата и исходным его значением в каждой из точек. Поскольку не все данные имели нормальное распределение и условие равенства дисперсий распределений признаков в сравниваемых группах не соблюдалось, применяли непараметрический критерий Манна-Уитни для независимых групп с проверкой нулевой статистической гипотезы об отсутствии различий в группах, вычисляли медиану, верхний и нижний квартили. Анализ всех параметров исследования проводился для парных глаз отдельно.

С целью визуализации полученных результатов динамика показателей КСП была представлена в виде графических диаграмм (рис.1А, 1Б).

При оценке динамики данных КСП отмечались значительные различия показателей между группами. Полученные данные свидетельствуют о более выраженной положительной динамике показателей КСП в ходе постановки разгрузочной пробы справа, что коррелирует с асимметрией выраженности клинических признаков на парных глазах (рис.2).

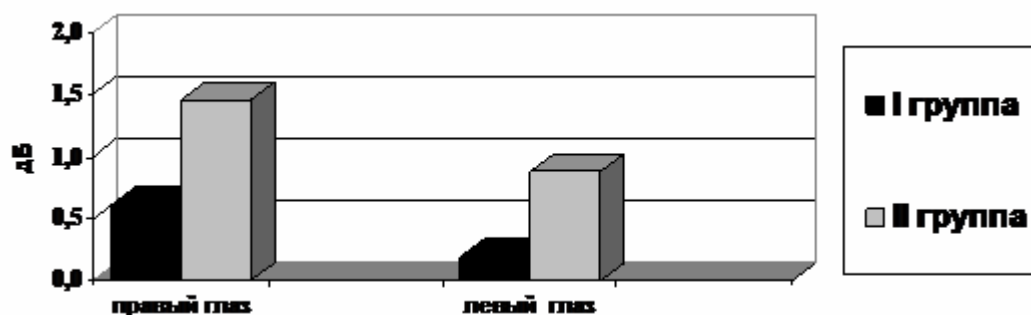


Рис. 2. Средние значения динамики показателей КСП у пациентов I и II групп с подтвержденным диагнозом ПОУГ

## Заключение

Возможная индивидуальная непереносимость лекарственных средств, наличие побочных эффектов, особенность оптической коррекции, режим использования, комплаентность пациента, а также сопутствующие общесоматические заболевания обуславливают предпочтение монотерапии современными гипотензивными препаратами. Однако, эффективность фармакологического агента в каждом индивидуальном случае неодинакова. Абсорбционная способность, селективность взаимодействия с клетками-мишенями и ряд других факторов могут являться причиной недостаточного терапевтического воздействия. Нами обоснован выбор патогенетической терапии ПОУГ при подтверждении диагноза: монотерапия в случае выраженной положительной динамики показателей КСП при постановке разгрузочной пробы и отсутствии противопоказаний к использованию гипотензивного средства у конкретного пациента.

---

### Список литературы

1. Нестеров А.П. Глаукома. –М.:Медицина,1995.
2. Нестеров А.П., Егоров Е.А. Медикаментозное гипотензивное лечение глаукомы. // Клиническая фармакология и терапия.–1994.–Т.3–№2.–с.86–88.
3. Егоров А.Е. Изучение гипотензивного действия и побочных эффектов ингибитора карбоангидразы дорзоламида гидрохлорида.// Вестник офтальмологии – 1996–№2–с.3–4.
4. Al-Jazzaf A.M., Desantis L., Netland P.A. Travoprost: a potent ocular hypotensive agent.// Drugs of today. -2003.-V. 39.-P. 1-14.
5. Bayer A.; Ferrari F.; Maren T.H.; Erb C. Topical carbonic anhydrase inhibitors in the treatment of glaucoma. // J-Fr-Ophtalmol. 1996; 19(5): 357–362.
6. Sugrue MF.: Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. Prog Retin Eye Res 2000 Jan;19(1):87–112.

---

**Подопригора Владимир Сергеевич** – аспирант  
Воронежского государственного технического  
университета

**Львович Яков Евсеевич** – д-р техн. наук,  
профессор Воронежского государственного  
технического университета, зав. кафедрой САПРИС,

**Podoprigora Vladimir S.** - Post-graduate Student of  
Voronezh State Technical University (VSTU), тел.  
525424

**L'vovich Ya.kov E.** - Head of the Department  
SAPRIS, Dr.Sc., Professor