

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Научный журнал
Выходит 6 раз в год

Том 24, № 2, 2024

ISSN 1680-0613

УЧРЕДИТЕЛЬ:

ФГБОУ ВО «Воронежский
государственный университет»

Журнал основан в декабре 2000 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия. Свидетельство ПИ № ФС77-28319 от 15 июня 2007 года

Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Журнал принимает публикации и статьи по специальностям: 1.4.1. Неорганическая химия (химические науки), 1.4.2. Аналитическая химия (химические науки), 1.4.4. Физическая химия (химические науки), 1.4.6. Электрохимия (химические науки), 1.4.7. Высокомолекулярные соединения (химические науки), 1.4.9. Биоорганическая химия (химические науки), 1.4.10. Коллоидная химия (химические науки), 1.5.4. Биохимия (биологические науки), 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), 1.5.6. Биотехнология (химические науки)

Индексируется:

Scopus, РИНЦ, RSCI, Chemical Abstract, EBSCO, DOAJ, CrossRef

При перепечатке ссылка на «Сорбционные и хроматографические процессы» обязательна

Адрес редакции, издателя:
394018, Воронеж, Университетская пл., 1,
Воронежский государственный
университет
Тел. (473) 220-89-32.
E-mail: journal@chem.vsu.ru
<http://www.sorpchrom.vsu.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

В.Ф. Селеменев, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

А.К. Буряк, д-р хим.наук, проф. (ИФХЭ РАН, Москва)
О.Б. Рудаков, д-р хим.наук, проф. (ВГТУ, Воронеж)

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

О.В. Бобрешова, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
Е.В. Бутырская, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
В.И. Васильева, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
А.М. Долгоносков, д-р хим. наук, вед. науч. сотр. (ГЕОХИ РАН, Москва)
В.И. Дейнека, д-р хим.наук, проф. (НИУ «БелГУ», Белгород)
А.Н. Зяблов, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
А.Т. Епринцев, д-р биол.наук, проф. (Воронеж)
В.А. Иванов, д-р хим.наук, проф. (МГУ, Москва)
А.И. Калинин, д-р хим.наук, проф. (ИФХЭ РАН, Москва)
С.И. Карпов, д-р хим.наук, доц. (Воронеж)
Т.А. Кравченко, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
С.Н. Ланин, д-р хим.наук, проф. (МГУ, Москва)
Ю.А. Лейкин, д-р хим.наук, проф. (РХТУ, Москва)
В.М. Мухин, д-р техн.наук, проф. (НПО «Неорганика», Электросталь)
Б.Ф. Мясоедов академик РАН, д-р хим.наук, проф. (ИФЭХ РАН, Москва)
П.Н. Нестеренко д-р хим.наук, проф. (МГУ, Москва)
И.А. Платонов, д-р техн.наук, проф. (СГАУ, Самара)
Т.Н. Попова, д-р биол.наук, проф. (Воронеж)
SenGupta Arup, Ph.D., prof. (Lehigh University, Bethlehem, U.S.A)
С.М. Староверов, д-р хим.наук (МГУ, Москва)
Р.Х. Хамизов, д-р хим.наук (ГЕОХИ РАН, Москва)
В.Ю. Хохлов, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
О.А. Шпигун, член-корреспондент РАН (МГУ, Москва)

Ответственные секретари:

И.В. Воронюк, канд. хим.наук (Воронеж)
Л.Н. Коломиец, канд. хим.наук (ИФЭХ РАН, Москва),

Материалы журнала доступны по лицензии Creative Commons "Attribution" («Атрибуция») 4.0



©Воронежский государственный университет, 2024

SORPTION AND CHROMATOGRAPHY PROCESSES

Scientific journal
Published 6 times per year

Volume 24, No 2, 2024

ISSN 1680-0613

FOUNDER:

Voronezh State University

Journal was founded in December 2000

Journal has been registered by Federal Service for Supervision for Compliance with the Law in the Sphere of Mass Communications and Cultural Heritage Protection. Certificate PI № FS 77-28319 from 15 June 2007.

The journal is included in the List of Russian Peer-Reviewed Scientific Journals recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science that publishes dissertation abstracts submitted as partial fulfillment of the requirements for the degrees of Candidate and Doctor Sciences.

The journal accepts publications and articles on specialties: 1.4.1. Non-organic chemistry (chemical sciences), 1.4.2. Analytical Chemistry (Chemical sciences), 1.4.4. Physical Chemistry (Chemical Sciences), 1.4.6. Electrochemistry (Chemical sciences), 1.4.7. High Molecular Compounds (Chemical sciences), 1.4.9. Bioorganic Chemistry (Chemical sciences), 1.4.10. Colloidal Chemistry (chemical sciences), 1.5.4. Biochemistry (biological sciences), 1.5.6. Biotechnology (biological sciences), 1.5.6. Biotechnology (Chemical sciences)

Journal is indexed: Russian Scientific Index Citations, Scopus, Chemical Abstract, EBSCO, DOAJ, CrossRef

Editorial Board Office, Publisher:
1, Universitetskaya pl., 394018,
Voronezh, Russian Federation
Phone number +7 (473) 220-89-32.

E-mail: journal@chem.vsu.ru
http://www.sorpchrom.vsu.ru

EDITOR-IN-CHIEF:

V.F. Selemenev, Prof., Dr.Sc. (Voronezh)

DEPUY-EDITORS-IN-CHIEF:

A.K. Buryak, Dr.Sc., Prof. (IPCE RAS, Moscow)
O.B. Rudakov, Dr.Sc., Prof. (VSTU, Voronezh)

EDITORIAL BOARD:

O.V. Bobreshova, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)
E.V. Butyrskaya, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)
V.I. Vasil'eva, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)
A.M. Dolgonosov, Leading scientific researcher (GEOKHI RAS, Moscow)
V.I. Deineka, Dr.Sc., Prof., (Belgorod State National Research University, Belgorod)
A.N. Zyablov, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)
A.T. Eprintcev, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)
V.A. Ivanov, Dr.Sc., Prof. (MSU, Moscow)
A.I. Kalinichev, Dr.Sc., Prof. (IPCE RAS, Moscow)
S.I. Karpov, Dr. Sc., Assoc. Prof. (Voronezh)
T.A. Kravchenko, Dr. Sc., Prof. (Voronezh)
S.N. Lanin, Dr.Sc., Prof. (MSU, Moscow)
Yu.A. Leykin, Dr.Sc., Prof. (MUCTR, Moscow)
V.M. Mukhin, Dr.Sc., Prof. (SPA «Neorganika», Electrosal')
B.F. Myasoedov, Academician of the RAS, Dr.Sc., Prof. (IPEC RAS, Moscow)
P.N. Nesterenko, Dr.Sc., Prof. (MSU, Moscow)
I.A. Platonov, Dr.Sc., Prof. (SSAU, Samara)
T.N. Popova, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)
SenGupta Arup, Ph.D., prof. (Lehigh University, Bethlehem, U.S.A)
S.M. Staroverov, Dr.Sc., Prof. (MSU, Moscow)
R.Kh. Khamizov, Dr.Sc., Prof. (GEOKHI RAS, Moscow)
V.Yu. Khokhlov, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)
O.A. Shpigun, corresponding member of the RAS (MSU, Moscow)

Responsible secretaries:

I.V. Voronyuk, Ph.D. (Voronezh)
L.N. Kolomietz, Ph.D. (IPCE RAS, Moscow)

When reprinting the materials, a reference to the Sorption and chromatography processes must be cited

All the material of the journal are available under Creative Commons Attribution 4.0 license



© Voronezh State University, 2024

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

2024, Том 24, №2



Выходит 6 раз в год

CONTENTS

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- | | | |
|---|---------|---|
| <p>Селеменев В.Ф., Дейнека В.И., Макаревич С.Л., Елисеева Т.В., Блинов Д.Н., Дейнека Л.А.
Фенольные кислоты и полидатын плодов винограда и продукции его переработки</p> | 162-169 | <p>Selemenev V.F., Deineka V.I., Makarevich S.L., Eliseeva T.V., Blinov D.N., Deineka L.A.
Phenolic acids and polydatin of grape and products of its processing</p> |
| <p>Карпюк Е.А., Пастухов А.В., Гавлина О.Т., Каргов С.И., Иванов В.А.
Упруго-пластические свойства ионообменников на основе сшитых полиэлектролитов</p> | 170-179 | <p>Karpyuk E.A., Pastukhov A.V., Gavlina O.T., Kargov S.I., Ivanov V.A.
Elastoplastic properties of ion exchangers based on cross-linked polyelectrolytes</p> |
| <p>Платонов И.А., Платонов В.И., Колесниченко И.Н., Родинков О.В., Брыксин А.С., Маргарян А.Э., Колесниченко Д.Л.
Экспресс-анализ ацетона в выдыхаемом воздухе при диагностике сахарного диабета</p> | 180-196 | <p>Platonov I.A., Platonov V.I., Kolesnichenko I.N., Rodinkov O.V., Bryksin A.S., Margaryan A.E., Kolesnichenko D.L.
Express analysis of acetone in exhaled air for diagnosing diabetes mellitus</p> |
| <p>Рудаков Я.О., Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б.
Хроматографические подходы в контроле качества пищевой продукции по химическому составу</p> | 197-208 | <p>Rudakov Ya.O., Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B.
Chromatographic approaches to food quality control by chemical composition</p> |
| <p>Зайцева Е.А., Долгоносов А.М.
Теоретический расчет параметров метода трехпараметрической характеристики хроматографических фаз. I. Параметр дисперсионных сил – обобщенный заряд</p> | 209-226 | <p>Zaitceva E.A., Dolgonosov A.M.
Theoretical calculation of the parameters of the three-parameter chromatographic phase characterization method. I. Dispersion forces parameter – generalized charge.</p> |
| <p>Коровкина А.О., Ву Хоанг Иен, Белобородова Н.В., Выборный А.Ю., Зяблов А.Н.
Определение 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты амперометрическим сенсором с молекулярно-импринтированными полимерами</p> | 227-235 | <p>Korovkina A.O., Wu Hoang Yen, Beloborodova N.V., Vybornyi A.Yu., Zyablov A.N.
Determination of 3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid by an amperometric sensor with molecularly imprinted polymers</p> |

Платонов И.А., Муханова И.М., Лабает М.Ю., Салтанова А.А. Анализ синтетических красителей в сточных водах методом ВЭЖХ	236-245	Platonov I.A., Mukhanova I.M., Labaev M.Yu., Saltanova A.A. HPLC analysis of synthetic dyes in wastewater
Машина Е.В., Шанина С.Н., Амосова О.Е. Хроматографический анализ аминокислотного состава желчных камней	246-256	Mashina E.V., Shanina S.N., Amosova O.E. Chromatographic analysis of the amino acid composition of gallstones
Луценко Д.Н., Компанцева Е.В., Чиряпкин А.С., Гарсия Е.Р., Озеров А.А., Сливкин А.И., Семенов В.Ф., Шихалиев Х.С., Кодониди И.П. Изучение стабильности биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с использованием электрофореза и масс-спектрометрии	257-267	Lutsenko D.N., Kompantseva E.V., Chiriapkin A.S., Garsiya E.R., Ozerov A.A., Slivkin A.I., Selemenev V.F., Shikhaliev Kh.S., Kodonidi I.P. Study of the stability of the biologically active compound N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazoliny]propionyl]-guanidine using electrophoresis and mass spectrometry
Никонова А.А., Рохина Е.Ф., Глызина О.Ю., Дылгерова С.Д., Чиндявская А.Н., Рохин А.В., Пройдаков А.Г. Тонкослойная хроматография метилированных производных алкилбензолсульфонатов натрия в анализе воды методом ГХ-МС	268-280	Nikonova A.A., Rokhina E.F., Glyzina O.Yu., Dylgerova S.D., Chindyavskaya A.N., Rokhin A.V., Proydakov A.G. Thin layer chromatography of methylated derivatives of sodium alkylbenzenesulfonates in water analysis by GC-MS
Титов Е.Н., Смальченко Д.Е., Лебедева О.Е. Диффузионная и химическая кинетика адсорбции метиленового голубого на кремнеземах, допированных ионами железа (III)	281-288	Titov E.N., Smalchenko D.E., Lebedeva O.E. Diffusion and chemical kinetics of methylene blue dye ad-sorption on silica doped with iron (III) ions
Федорин Д.Н., Хомутова А.Е., Епринцев А.Т. Оценка образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775A электрофоретическим методом в листьях кукурузы при нормоксии и гипоксии	289-298	Fedorin D.N., Khomutova A.E., Eprintsev A.T. Electrophoretic method and assessing the formation of an RNA-interfering complex with miR775A in corn leaves under the conditions of normoxia and hypoxia



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544.5:634.8

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12121

Фенольные кислоты и полидатын плодов винограда и продукции его переработки

Владимир Федорович Селеменев¹, Виктор Иванович Дейнека²✉, Сергей Леонидович Макаревич³, Татьяна Викторовна Елисеева¹, Дмитрий Николаевич Блинов², Людмила Александровна Дейнека²

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, dein1559vi@yandex.ru✉

³Белгородский филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ», Белгород, Россия

Аннотация. В работе установлено, что в плодах красного винограда и в продуктах его переработки основными фенольными кислотами являются не хлорогеновая (продукт ацилирования хинной кислоты кофейной), как указывается в ряде публикаций, а кафтаровая (продукт ацилирования винной кислоты кофейной) и коутаровая (продукт ацилирования винной кислоты *n*-кумаровой). Для хроматографирования исследованных образцов была выбрана стационарная фаза Symmetry C18 и подвижные фазы системы «ацетонитрил – 10 об.% муравьиной кислоты – вода», удобные при определении антоцианов винограда. Показано, что кафтаровая кислота во всех исследованных составах подвижной фазы полностью отделяется от коутаровой и от трех изомерных монокофеоилхинных кислот (3-кофеоилхинной, 4-кофеоилхинной и 5-кофеоилхинной), т.е. идентификация по временам удерживания этих кислот возможна. Однако для хроматографирования следует выбирать составы подвижной фазы, при которых нет соэлюирования какой-либо из этих кислот с обычно присутствующим в экстрактах, соках и винах дельфинидин-3-глюкозидом. Полное разделение указанных компонентов возможно как при относительно низком содержании ацетонитрила (менее 6 об.%) в подвижной фазе, так и при относительно высоком (не менее 8.5 об.%). Это позволило предложить вариант градиентного элюирования для разделения всех интересующих соединений. Градиентный режим требуется для элюирования из колонки всех антоцианов и сопутствующих экстрактивных веществ.

При этом, предложенные условия разделения оказались благоприятными для детектирования полидатына (одного из изомерных глюкозидов ресвератрола). Это позволило опровергнуть еще одно распространенное заблуждение, согласно которому ресвератрол (а не его глюкозид) является одним из важнейших биологически активных веществ в винограде. В предложенных условиях значительно сильнее удерживаемый ресвератрол соэлюируется с одним из ацилированных антоцианов, но анализ площадей соответствующих пиков свидетельствует о том, что именно полидатын выступает доминирующей формой присутствия ресвератрола в винограде.

Ключевые слова: ВЭЖХ, градиентный режим элюирования, виноград, кафтаровая, коутаровая, хлорогеновая кислоты, полидатын, ресвератрол.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект FZGU-2023-0009.

Для цитирования: Селеменев В.Ф., Дейнека В.И., Макаревич С.Л., Елисеева Т.В., Блинов Д.Н., Дейнека Л.А. Фенольные кислоты и полидатын плодов винограда и продукции его переработки // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 162-169. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12121>



Original article

Phenolic acids and polydatin of grape and products of its processing

Vladimir F. Selemenev¹, Victor I. Deineka², Sergey L. Makarevich³,

Tatiana V. Eliseeva¹, Dmitry N. Blinov², Lyudmila A. Deineka²

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

²Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, deineka@bsu.edu.ru

³Belgorod branch of the Federal State Budgetary Institution "ARRIAH", Belgorod, Russian Federation

Abstract. The paper established that in the fruits of red grapes and in the products of its processing, the main phenolic acids are not chlorogenic acids (the acylation product of quinic acid by caffeic one), as indicated in a number of publications, but caftaric acid (the acylation product of tartaric acid by caffeic one) and coutaric acid (the acylation product of tartaric acid by p-coumaric one). For chromatographic analysis of the studied samples, the stationary phase Symmetry C18 and the mobile phases of the “acetonitrile – 10 vol.% of HCOOH-water” system were chosen, being convenient for determining grape anthocyanins. It was shown that caftaric acid in all studied mobile phase compositions is completely separated from coutaric acid and from three isomeric monocaffeoylquinic acids (3-caffeoylquinic, 4-caffeoylquinic and 5-caffeoylquinic), i.e. there is no confusion between the retention times of these acids. But for chromatography, mobile phase compositions should be selected in which there is no co-elution of any of these acids with delphinidin-3-glucoside, which is usually present in extracts, juices and wines. Complete separation of these components is possible both with a relatively low acetonitrile content (less than 6 vol. %) in the mobile phase, and with a relatively high (at least 8.5 vol. %) as well. This made it possible to propose a gradient elution option for separating all compounds of interest. A gradient mode was needed to elute all anthocyanins and associated extractives from the column.

It turned out that the proposed separation conditions were favorable for the detection of polydatin (one of the isomeric glucosides of resveratrol). This made it possible to establish another common misconception, according to which it is claimed that resveratrol (and not its glucoside) is one of the most important biologically active substances in grapes. Under the proposed conditions, much more strongly retained resveratrol coelutes with one of the acylated anthocyanins, but analysis of the areas of the corresponding peaks indicates that polydatin is the dominant form of resveratrol in grapes.

Keywords: HPLC, gradient elution mode, grapes, chlorogenic, coutaric, chlorogenic acids, polydatin, resveratrol.

Acknowledgments: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the state assignment to universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project FZGU-2023-0009.

For citation: Selemenev V.F., Deineka V.I., Makarevich S.L., Eliseeva T.V., Blinov D.N., Deineka L.A. Phenolic acids and polydatin of grape and products of its processing. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2024. 24(2): 162-169. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12121>

Введение

Хлорогеновая кислота (точнее, один из ее возможных изомеров – 5-кофеоил-хинная кислота, I схема 1) является важнейшим вторичным метаболитом многих растений [1], отвечающим за антиоксидантные свойства благодаря наличию в структуре радикала кофейной кислоты пары гидроксильных групп, находящихся в *орто* положении друг к другу [2]. Это соединение является одним из эфиров кофейной и хинной кислот (I, схема 1).

О наличии хлорогеновой кислоты в плодах винограда сообщается в работах

[3-7]. Однако в других публикациях вместо хлорогеновой обнаруживают кислоты: каftarовую (II, схема 1) (кофеоил-винную) [8-12] и коутаровую (III, схема 1, продукт замены радикала кофейной кислоты на радикал *пара*-кумаровой кислоты [8]). При этом каftarовая и коутаровая кислоты найдены и в других частях винограда [10, 13, 14], а в листьях – еще и хлорогеновая кислота [14]. Отметим, что и хлорогеновая, и каftarовая кислоты содержат радикалы кофейной кислоты, что обеспечивает проявление антиоксидантных свойств материалов, их содержащих, но биологическое действие этих кислот не эквивалентно [12].

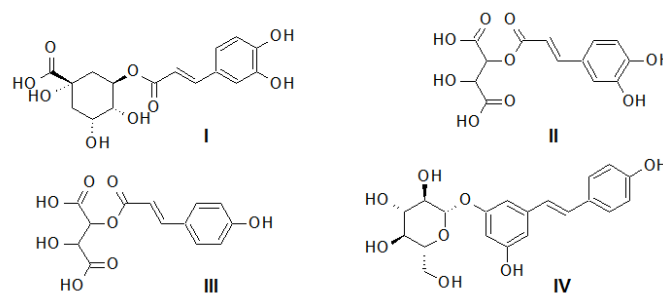


Схема 1. Структура хлорогеновой (I, 5CQA), кафтаровой (II, CafA) и коутаровой (III, CouA) кислот и полидатаина (IV, GR)

Scheme 1. The structure of chlorogenic (I, 5CQA), caftaric (II), and coumaric (III) acids and polydatin (IV)

Еще два биологически активных вещества упоминаются как важнейшие компоненты плодов винограда – ресвератрол и один из его возможных глюкозидов полидатын (IV, схема 1). Информация об этой паре соединений также противоречива. В работе [15] указывается на большую роль ресвератрола из плодов винограда в предупреждении ряда заболеваний, в том числе, в проявлении так называемого «французского парадокса» – низкой частоты заболеваний сердечно-сосудистой системы при традиционной жирной диете. Накапливающийся только в кожуре плодов *транс*-ресвератрол определяли методом ВЭЖХ в работе [16] со спектрофотометрическим детектированием, а в работе [17] – с электрохимическим детектированием. Но концентрация *транс*-ресвератрола в плодах винограда невелика – порядка 0.3 мг в 1 кг плодов, поэтому трудно рассматривать виноград как источник для выделения этого важного соединения. Однако в работе [17] приводятся данные о том, что в корешках винограда содержание этого соединения может быть на 2 порядка выше. Это напоминает рейнутрию японскую, корни которой являются прекрасным источником ресвератрола [18]. Однако в работе [19] при анализе всех производных ресвератрола в соке виноградов 36 сортов было установлено, что основное соединение в исследованных образцах – *транс*-полидатын (или *транс*-пицеид), содержание которого находится на уровне 3 мг на 1 дм³.

Таким образом, тип фенольной кислоты и форма ресвератрола в плодах винограда требуют уточнения. Причем, определение этих соединений желательно проводить параллельно с определением антоцианов в условиях высокой кислотности для перевода антоцианов в удобную для детектирования флавилиевую форму, т.е. при pH около 1 [20]. Это стало задачей настоящего исследования.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использованы два сорта красного винограда, происходящие из Перу и ЮАР, два сока марки «Добрый» и пять образцов красных вин различных производителей. В работе также использовали хлорогеновой кислоты полугидрат (chlorogenic acid hemihydrate, Aldrich, США) и ресвератрол (Китай). В качестве метчика полидатын применяли компонент экстракта красных проростков рейнутрии японской с характеристичным для ресвератрола электронным спектром поглощения.

Разделение антоцианов осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. В работе использовали хроматографическую колонку 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм). Для создания подвижных фаз при изократическом и градиентном элюировании применяли фазу А (6 об.% ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде) и фазу Б (30 об.% ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде); обе

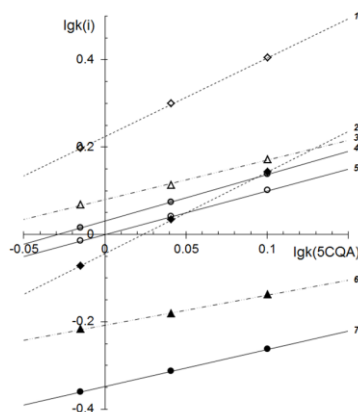


Рис. 1. Карта разделения ряда фенольных кислот и антоцианов на стационарной фазе Symmetry C18, 3.5 мкм относительно 5CQA в подвижных фазах системы «7.4 ÷ 8.8 об. % CH₃CN – 10 об. % HCOOH в воде» при 40°C.

lgk(i) – логарифмы факторов удерживания соединений;

Вещества: 1 – Cy3Glu; 2 – Dp3Glu; 3 – CouA; 4 – 4CQA; 5 – 5CQA; 6 – CafA; 7 – 3CQA.

Fig. 1. The separation map of a number of phenolic acids and anthocyanins in the Symmetry C18 stationary phase, 3.5 μm in the mobile phases of the system “7.4 ÷ 8.8 vol. % CH₃CN – 10 vol. % HCOOH in water” at 40°C.

Substances: (1) cyanidin-3-glucoside; (2) delphinidin-3-glucoid; (3) coumaric acid; (4) 4-caffeoylquinic acid; (5) 5-caffeoylquinic acid; (6) caftaric acid; (7) 3-caffeoylquinic acid.

фазы смешивали в заданном соотношении для исследования хроматографического поведения соединений. Высокое содержание муравьиной кислоты обеспечивает pH около 1.6, что соответствует полному подавлению диссоциации анализируемых кислот. Градиентный режим: 0 мин – 12% Б; 5 мин – 12% Б; 25 мин – 100% Б; 26 мин 12% Б. Мертвое время определяли по удерживанию щавелевой кислоты. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали в программе ChemStation, а расчеты выполняли в MS Excel.

Обсуждение результатов

Результаты исследования хроматографического поведения трех изомерных хлорогеновых, кафтаровой (CafA) кислот и двух антоцианов с наименьшим временем удерживания – дельфинидин-3-глюкозида (Dp3Glu) и цианидин-3-глюкозида (Cy3Glu) - представлены на рис. 1. Отметим, что для корректности в работе рассматривали не только 5-кофеилхинную кислоту, 5CQA, но и два других ее изомера, 4CQA и 3CQA, часто обнаруживаемых в ряде растительных материалов в

различных соотношениях. К этим соединениям была добавлена и коутаровая (CoutA) кислота, хотя ее антиоксидантные свойства существенно менее выражены, чем у хлорогеновых и кафтаровой кислот.

Как следует из представленных данных, кафтаровая кислота удерживается сильнее, чем 3CQA, но слабее чем 5CQA, и никаких проблем в разделении всех важных в данном случае кислот нет, поскольку и порядок элюирования, и полнота разделения в рассмотренном диапазоне концентраций ацетонитрила (от 7.4 до 8.8 об. %) остаются неизменными:

$$t_R(3CQA) < t_R(CafA) < t_R(5CQA) < t_R(4CQA) < t_R(CoutA).$$

Дифференциация всех соединений этого ряда может быть выполнена по характерной форме электронных спектров поглощения, близких для всех кофеилхинных кислот [21], на 2 нм батохромно смещающихся в случае кафтаровой кислоты. Для коутаровой кислоты характерен спектр с гипсохромным смещением максимума абсорбции. А антоцианы

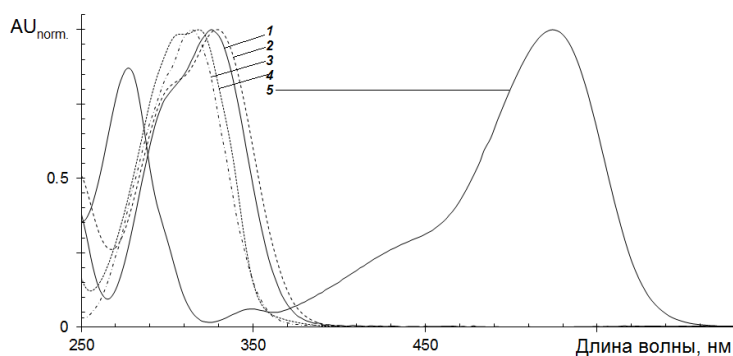


Рис. 2. Электронные спектры поглощения соединений:
1 – 5CQA; 2 – CafA; 3 – CouA; 4 – GR; 5 – Dp3Glu
Fig. 2. Electronic absorption spectra of the compounds:
1 – 5CQA; 2 – CafA; 3 – CouA; 4 – polydatin; 5 – Dp3Glu

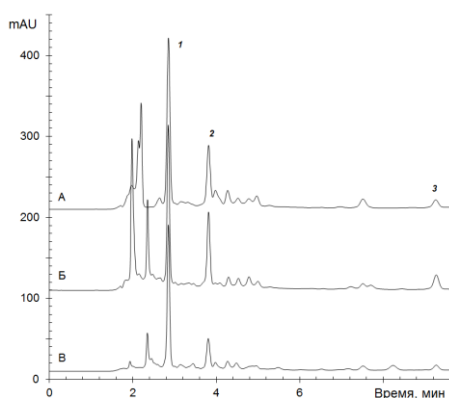


Рис. 3. Разделение компонентов винограда и продуктов его переработки в условиях градиентного режима; запись при длине волны 325 нм. Хроматограммы: А – вина «Кагор Партенит», Б – сока красного винограда марки «Добрый» и В – экстракта винограда из Перу. Компоненты: 1 – CafA, 2 – CouA; 3 – GR.

Fig. 3. Separation of grape components under the conditions of the gradient mode recorded at a wavelength of 325 nm. Chromatograms: A – o Kagor Partenit wines, B – Dobry red grape juice, and C – grape extract from Peru. Components: 1 – caftaric acid, 2 – coumaric acid; 3 – polydatin.

имеют максимум не только в УФ-области, но и в видимом диапазоне электромагнитного спектра, рис. 2. К ним добавлен и характерный спектр полидатына. Отметим, что в элюентах с меньшей элюирующей силой пик коутаровой кислоты раздваивается, вероятно из-за разделения *цис*- и *транс*-форм.

В рассмотренном ряду удерживание Dp3Glu, изменяется намного быстрее рассмотренных кислот, что позволяет использовать составы подвижных фаз с содержанием ацетонитрила не менее 8.5 об.%. Это позволило подобрать градиентный режим, в котором хорошо разделялись

целевые компоненты при контроле состава фенольных кислот в экстрактах винограда, в виноградном соке и в винных материалах, рис. 3.

Выполненный анализ показал, что во всех исследованных в работе сортах красного винограда и в продуктах его переработки детектируются только каftarовая и коутаровая кислоты при полном отсутствии хлорогеновых кислот. Причем, как показывает ретро анализ 3-D ранее записанных хроматограмм большого числа экстрактов выращенных в Белгороде виноградов [22], наличие этих кислот характерно как для сортов вида *Vitis vinifera*



era, так и для сортов гибридных виноградов. Отметим, что ни в одной из исследованных проб не было обнаружено изомерных хлорогеновых кислот, хотя 5CQA в качестве главного компонента появилась в смеси виноградного и яблочного сока (марки «Добрый»). Это не удивительно, поскольку эта кислота является главной именно в яблоках.

Выбранный вариант градиентного элюирования оказался удобным и для детектирования полидатына (рис. 3), пик которого полностью отделяется от соседних пиков и который может быть детектирован по характеристическому электронному спектру поглощения. Этот пик по времени удерживания совпал с пиком полидатына, экстрагированного из проростков рейнутрии японской [23]. В этих условиях элюирования время удерживания более липофильного ресвератрола оказалось существенно большим ($t_R=15.10$ мин), чем полидатына (гликозилированного ресвератрола), но пик этого соединения совпадал с пиком одного из ацилированных антоцианов, поэтому строгое сопоставление содержания поли-

датына и ресвератрола по площадям пиков невозможно, хотя превалирование именно полидатына не вызывает сомнения. Следовательно, можно утверждать, что основная форма нахождения ресвератрола в исследованных образцах винограда и продуктов его переработки – полидатын, а не сам ресвератрол.

Заключение

Таким образом, в работе показано, что основные фенольные кислоты плодов красных виноградов – кафтаровая и коутаровая, а не хлорогеновая. Предложенный работе градиентный режим элюирования позволил также установить, что основная форма ресвератрола в винограде – полидатын (или пицеид) – глюкозид ресвератрола.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Naveed M., Hejazi V., Abbas M., Kamboh A.A., Khan G.J., Shumzaid M., Ahmad F., Babazadeh D., Xia F.-F., Modarresi-Ghazan F., Li W.-H., Zhou X.-H. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further Research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 97: 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
2. Xu J.-G., Hu Q.-P., Liu Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60(46): 11625-11630. <https://doi.org/10.1021/jf303771s>
3. Mizin V.I., Iezhov V.V., Dudchenko L.S., Severin N.A., Yalaneckyy A.Ya. Grape wine chlorogenic acids offset the development of metabolic syndrome. *Russian Open Medical Journal* 2021; 10(4): Article CID e0409. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2021.0409>
4. Ozkan K., Karadag A., Sagdic O. The effects of different drying methods on the in vitro bioaccessibility of phenolics, antioxidant capacity, minerals and morphology of black 'Isabel' grape. *LWT*. 2022; 158: 113185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113185>
5. Doshi P., Adsule P., Banerjee K., Oulkar D. Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L) byproducts. *J. Food Sci. Technol.* 2015; 52(1): 181-190. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0991-1>
6. Rodrigues R.P., Sousa A.M., Gando-Ferreira L.M., Quina M.J. Grape Pomace as a Natural Source of Phenolic Compounds: Solvent Screening and Extraction Optimization. *Molecules*. 2023; 28: 2715. <https://doi.org/10.3390/molecules28062715>
7. Mota A., Pinto J., Fartouce I., Correia M.J., Costa R., Carvalho R., Aires A., Oliveira A.A. Chemical Profile and Antioxidant potential of four table grape (*Vitis vinifera*) cultivars grown in Douro Region, Portugal. *Ciência Téc. Vitiv.* 2018; 33(2): 125-135. <https://doi.org/10.1051/ctv/20183302125>



8. Singleton V.L., Zaya J., Trousdale E.K. Caftaric and coumaric acids in fruit of *Vitis*. *Phytochem.* 1986; 25(9): 2127-2133. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(86\)80078-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(86)80078-4)
9. Singleton V.L., Zaya J., Trousdale E., Salgues M. Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis*. 1984; 23: 113-120. <https://doi.org/10.5073/vitis.1984.23.113-120>
10. Šuković D., Knežević B., Gašić U., Sredojević M., Ćirić I., Todić S., Mutić J., Tešić Ž. Phenolic Profiles of Leaves, Grapes and Wine of Grapevine Variety Vranac (*Vitis vinifera* L.) from Montenegro. *Foods*. 2020; 9: 138. <https://doi.org/10.3390/foods9020138>
11. Vendramin V., Viel A., Vincenzi S. Caftaric Acid Isolation from Unripe Grape: A “Green” Alternative for Hydroxycinnamic Acids Recovery. *Molecules*. 2021; 26: 1148. <https://doi.org/10.3390/molecules26041148>
12. Koriem K.M.M., Soliman R.E. Chlorogenic and Caftaric Acids in Liver Toxicity and Oxidative Stress Induced by Methamphetamine. *J. Toxicol.* 2014; 2014: 583494. <https://doi.org/10.1155/2014/583494>
13. Goufo P.I., Singh R.K., Cortez I. A Reference List of Phenolic Compounds (Including Stilbenes) in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Roots, Woods, Canes, Stems, and Leaves. *Antioxidants*. 2020; 9: 398. <https://doi.org/10.3390/antiox9050398>
14. Zhilyakova T.A., Chernousova I.V., Zajcev G.P., Grishin Yu.V., Mosolkova V.E., Solov'eva L.M. Fenol'nyj profil' molodyh pobegov vinograda sorta Kaberne Sovin'on, proizrastayushchego v usloviyah Yuzhnogo berega Kryma. «Magarach». *Vinogradarstvo i vinodelie*. 2023; 25(3): 312-318. <https://doi.org/10.34919/IM.2023.25.3.014> (In Russ.)
15. Singh C.K., Liu X., Ahmad N. Resveratrol, in its natural combination in whole grape, for health promotion and disease management. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1348(1): 150-160. <https://doi.org/10.1111/nyas.12798>
16. Geana E.I., Dinca O.R., Ionete R.E., Artem V., Niculescu V.C. Monitoring trans-Resveratrol in Grape Berry Skins During Ripening and in Corresponding Wines by HPLC. *Food Technol. Biotechnol.* 2015; 53(1): 73-80. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.01.15.3762>
17. Kolouchová-Hanzlíková I., Melzoch K., Filip V., Šmidrkal J. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chem.* 2004; 87: 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.028>
18. Alperth F., Melinz L., Fladerer J.-P., Bucar F. UHPLC Analysis of Reynoutria japonica Houtt. Rhizome Preparations Regarding Stilbene and Anthranoid Composition and Their Antimycobacterial Activity Evaluation. *Plants* 2021; 10: 1809. <https://doi.org/10.3390/plants10091809>
19. Romero-Pérez A.I., Ibern-Gómez M., Lamuela-Raventó R.M., de la Torre-Boronat M.C. Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 1533-1536. <https://doi.org/10.1021/jf981024g>
20. Pina F., Melo M.J., Maestri M., Passaniti P., Camaioni N., Balzani V. Photo- and pH-Induced Transformations of Flavylum Cation: “Write–Lock–Read–Unlock–Erase” Cycles. *Eur. J. Org. Chem.* 1999; 11: 3199-3207. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199911\)1999:11<3199::AID-EJOC3199>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199911)1999:11<3199::AID-EJOC3199>3.0.CO;2-X)
21. Blinova I.P., Oleinits E.Yu., Salasina Ya.Yu., Deineka V.I., Vu Thi Ngoc Anh, Nguyen Van Anh Simultaneous determination of chlorogenic acids and caffeine by reversed-phase HPLC. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2023; 66(2): 45-52. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20236602.6711>. (In Russ.)
22. Salasina Ya.Yu., Deineka V.I., Blinova I.P., Oleinits E.Yu., Deineka L.A., Makarevich S.L. Control of the selectivity of separation of grape anthocyanidin-3-glucosides and 3,5-diglucosides: Determination of anthocyanins in grape fruit grown in Belgorod region. *ChemChemTech*. 2023; 66(50): 72-79. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20236605.6784> (In Russ.)
23. Deineka V.I., Blinov D.N. *Rejnutriya yaponskaya – drug ili vrag? Innovations in life sciences: sbornik materialov V Mezhdunarodnogo simpoziuma, Belgorod, 24-26 maya 2023 g. Belgorod: ID «BelGU», 2023. S. 294-296 (In Russ.)*



Информация об авторах / Information about the authors

В.Ф. Селеменев – д.х.н., проф. каф. аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

В.И. Дейнека – профессор кафедры общей химии, д.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

С.Л. Макаревич – инженер-химик 1 категории, Белгородский филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» Белгород, Россия

Т.В. Елисеева – к.х.н., зав. кафедрой аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Д.Н. Блинов – аспирант кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Л.А. Дейнека – доцент кафедры общей химии, кандидат химических наук, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

V.F. Selemenev – DSci in chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: common@chem.vsu.ru

V.I. Deineka – Professor of General Chemistry Department. Dr. Sci.(Chemistry), Belgorod State University, Belgorod, Russia, e-mail: deineka@bsuedu.ru

S.L. Makarevich – chemical engineer of the 1st category, Belgorod branch of FGBI "VNIIZH" Belgorod, Russia, e-mail: sergmazay@yandex.ru

T.V. Eliseeva – Head of the Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: tatyanaeliseeva@yandex.ru

D.N. Blinov – Postgraduate student of the Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: Cezardik4@rambler.ru

L.A. Deineka – Docent of General Chemistry Department. Dr. Ph. (Chemistry), Belgorod State University, Belgorod, Russia, e-mail: deyneka@bsuedu.ru

Статья поступила в редакцию 23.02.2024; одобрена после рецензирования 13.03.2024; принята к публикации 20.03.2024.

The article was submitted 23.02.2024; approved after reviewing 13.03.2024; accepted for publication 20.03.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12123

Упруго-пластические свойства ионообменников на основе сшитых полиэлектролитов

**Екатерина Анатольевна Карпюк¹, Александр Валерианович Пастухов²,
Ольга Тихоновна Гавлина¹, Сергей Игоревич Каргов¹,
Владимир Александрович Иванов¹✉**

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
minilana@mail.ru✉

²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

Аннотация. В настоящей работе дилатометрически изучены упруго-пластические свойства сферических зерен промышленных слабокислотных и сильнокислотных ионитов в опытах с постоянным одноосным сжатием и последующей разгрузкой при комнатной температуре в зависимости от ионной формы и концентрации раствора электролита.

Показано, что ионная форма полиакрилата и полиметакрилата, сшитых, соответственно, диметакрилатом триэтиленгликоля и дивинилбензолом, и концентрация внешнего раствора влияют на их упруго-пластические свойства. В разбавленных растворах хлорида натрия и хлорида кальция гели проявляют упругие свойства с близкими относительными амплитудами деформирования. Амплитуда деформирования зерна полиметакрилата, сшитого дивинилбензолом, в Ni-форме в разбавленном растворе хлорида никеля оказалась значительно ниже, чем у Ca-формы, со значительным вкладом пластической деформации. С увеличением концентрации внешнего раствора хлоридов кальция и никеля под действием механической нагрузки на зерно полиметакрилата, сшитого дивинилбензолом, уменьшалась общая деформация гранулы, а также величина упругой деформации, а остаточные (пластические) деформации увеличивались. В концентрированных растворах CaCl₂ и NiCl₂ такой ионит становился неупругим жестким материалом, для которого даже при повышенных механических нагрузках величина упругих деформаций сжатия очень невелика.

Для набухшего в воде сильнокислотного полистирольного катионита с привитыми сульфогруппами, сшитого дивинилбензолом, в K-форме также характерны упругие деформации, т.е. полимер находится в высокоэластическом состоянии. Однако полистирольная матрица более жесткая по сравнению с полиакриловыми и полиметакриловыми катионитами в форме иона щелочного металла, поэтому амплитуда деформирования существенно меньше. Для такого катионита в Ca- и Ni-формах даже в концентрированных растворах преобладающими являются упругие деформации.

Ключевые слова: слабокислотные и сильнокислотные иониты, упруго-пластические свойства, дилатометрия.

Благодарности: работа выполнена в рамках госзадания (тема № 121031300090-2)

Для цитирования: Карпюк Е.А., Пастухов А.В., Гавлина О.Т., Каргов С.И., Иванов В.А. Упруго-пластические свойства ионообменников на основе сшитых полиэлектролитов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 170-179. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12123>

Original article

Elastoplastic properties of ion exchangers based on cross-linked polyelectrolytes

**Ekaterina A. Karpyuk¹, Alexander V. Pastukhov², Olga T. Gavlina¹,
Sergey I. Kargov¹, Vladimir A. Ivanov¹✉**

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, minilana@mail.ru✉

²Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

© Карпюк Е. А., Пастухов А. В., Гавлина О. Т., Каргов С. И., Иванов В. А., 2024



Abstract. In this paper, we dilatometrically studied the elastoplastic properties of spherical grains of industrial weakly acidic and strongly acidic ion-exchanger in experiments with constant uniaxial compression and a subsequent unload at room temperature, depending on the ionic form and concentration of the electrolyte solution. It was found that the ionic form of polyacrylate and polymethacrylate cross-linked with triethylene glycol dimethacrylate and divinylbenzene, respectively, and the concentration of the external solution affects their elastoplastic properties. In dilute solutions of sodium chloride and calcium chloride, the gels exhibited elastic properties with close relative amplitudes of deformation. The amplitude of deformation of the grain of polymethacrylate crosslinked with divinylbenzene, in the Ni form, in a dilute nickel chloride solution was significantly lower than that of the Ca form, with significant plastic deformation. With an increasing concentration of the external solution of calcium and nickel chlorides under mechanical load on the grain of polymethacrylate cross-linked with divinylbenzene, the total deformation of the granule and the magnitude of elastic deformation decreased, while the residual (plastic) deformations increased. In concentrated solutions of CaCl_2 and NiCl_2 , such an ion-exchanger became an inelastic rigid material. Even under increased mechanical load, the magnitude of its elastic compressive deformation was very small.

The K-form of a swollen in water strongly acidic polystyrene cation-exchanger with grafted sulpho groups cross-linked with divinylbenzene is also characterized by elastic deformations, i.e. the polymer is in a highly elastic state. However, the polystyrene matrix is more rigid compared to polyacrylic and polymethacrylic cation-exchangers in the alkali metal ion form, so the amplitude of deformation is significantly smaller. For such a cation-exchanger in Ca- and Ni- forms, elastic deformations prevail even in concentrated solutions.

Keywords: weakly acidic and strongly acidic ion-exchangers, elastoplastic properties, dilatometry.

Acknowledgements: the work was completed within the framework of the state task (topic No. 121031300090-2)

For citation: Karpyuk E.A., Pastukhov A.V., Gavlina O.T., Kargov S.I., Ivanov V.A. Elastoplastic properties of ion exchangers based on cross-linked polyelectrolytes. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 170-179. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12123>

Введение

Механическая прочность и осмотическая стабильность являются очень важными характеристиками ионообменных смол, так как они определяют потери ионита при его длительной эксплуатации. Известно, что наибольшие проблемы создаются так называемой осмотической нестабильностью вследствие изменения объема зерен при изменении солевого содержания, pH внешней среды и ионной формы. Зерна ионита способны выдерживать лишь определенное число циклов таких изменений, в результате чего происходит их раскалывание на мелкие осколки. В результате в промышленных ионообменных процессах очистки природных вод и конденсатов ежегодно приходится заменять значительное количество используемых ионообменников. В то же самое время считается, что ионообменные смолы являются весьма прочными с точки зрения прямого механического воздействия нагрузки на отдельные зерна, а также они не склонны к механи-

ческому истиранию. Поэтому исследованию их механических свойств уделялось значительно меньшее внимание, хотя с упруго-пластическими свойствами связаны и осмотическая нестабильность, и кинетическое поведение ионитов. Можно упомянуть лишь небольшое количество работ [1-4], в которых измерялись характеристики эластичности зерен ионита и ионообменных мембран при воздействии на них нагрузки.

В настоящей работе изучены упруго-пластические свойства ряда ионитов от ионной формы и концентрации раствора электролита. В отличие от всех предыдущих работ внимание уделено поведению зерен не только под действием нагрузки, но и после разгрузки.

Экспериментальная часть

Упруго-пластические свойства зерен ионитов в растворах электролитов при постоянном одноосном сжатии изучали при комнатной температуре dilatометрическим методом на универсальном испытательном приборе УИП-70 (рис. 1), совмещенном с компьютером, в котором

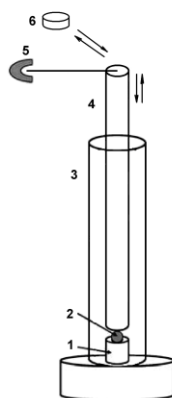


Рис. 1. Оборудование для регистрации изменения размеров набухшего полимерного зерна при нагружении: 1 – кварцевый держатель, 2 – набухшее полимерное зерно, 3 – стеклянная трубка, 4 – кварцевый скользящий стержень, 5 – датчик механического движения, 6 – нагрузка.

Fig. 1. Equipment to record changes in the size of swollen polymer grain under load:
1 – quartz holder, 2 – swollen polymer grain, 3 – glass tube, 4 – quartz sliding rod,
5 – mechanical motion sensor, 6 – load

накапливаются цифровые данные по изменению диаметра гранулы. Ранее в работах [5-8] было описано использование данного прибора для исследования процессов набухания зерен сверхсшитых полистирольных сорбентов и ионообменных смол.

В настоящей работе были исследованы образцы ионообменников на основе сшитых полиэлектролитов. Список исследованных полимеров включает следующее. КБ-4П2 – гелевый слабокислотный полиметакрилатный катионит, сшитый дивинилбензолом (около 1 моль сшивок на 60 моль метакриловых мономеров). КБ-2э3 – слабокислотный полиакрилатный гелевый катионит, сшитый диметакрилатом триэтиленгликоля (около 1 моль сшивок на 100 моль акриловых мономеров). КУ-2х8 – промышленный гелевый сульфокислотный полистирольный катионит, сшитый дивинилбензолом (6 вес.% или 1 моль сшивок на 14 моль стирольных мономеров).

Все образцы были промыты горячей водой и этанолом для удаления остатков адсорбированных поверхностно-активных веществ и экстракции других возможных выщелачиваемых веществ из по-

лимеров. Для измерений под микроскопом отбирались бездефектные сферические зерна диаметром (измеренным под микроскопом) 0.25-0.5 мм в случае КБ-4П2 и КБ-2э3 и 0.8-1.0 мм в случае КУ-2х8. Гранулу набухшего в определенном растворе полимера помещали в специально выточенное в кварцевой пластине сферическое углубление. На пластину с образцом наносили порцию равновесного с данным ионитом раствора электролита или воды объемом $\sim 0.02-0.03$ см³. Далее осуществляли одноосное сжатие гранулы кварцевым штоком с торцевой плоской поверхностью при определенной нагрузке. Регистрировали кривую изменения вертикального диаметра набухшей гранулы во времени при данной нагрузке (с точностью 1 мкм). После того, как диаметр гранулы переставал изменяться, нагрузку снимали, продолжали регистрировать кривую изменения диаметра гранулы во времени. Для каждой гранулы кривые «нагрузка – разгрузка» снимали для последовательно увеличивающихся нагрузок (5, 10, 20, 50, 100 или 200 г). Также для каждого ионита, равновесного с определенным раствором, отбирали не

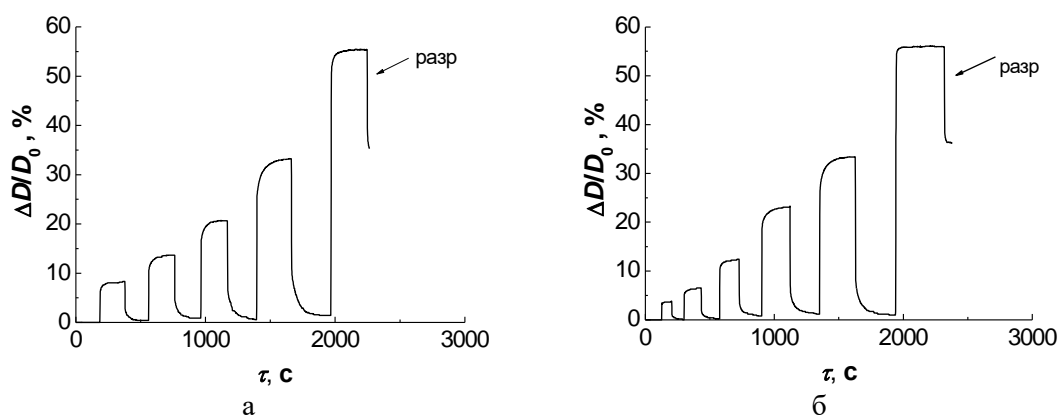


Рис. 2. Кривые изменения вертикального диаметра набухших сферических гранул ионитов КБ-2э3 (а) и КБ-4П2 (б) в Na-форме во времени при последовательной нагрузке (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 Н (а) и 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 2.0 Н (б)) и последующем снятии нагрузки.

Fig. 2. Curves of changes in the vertical diameter of swollen spherical granules of the KB-2e3 (a) and KB-4P2 (b) ion-exchangers in Na-form over time under successive load (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, and 1 N (a) and 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, and 2.0 N (b)) and subsequent unload

менее 3-х гранул и для них проводили однотипные измерения. В некоторых случаях эксперименты завершались разрушением гранул при максимальной нагрузке.

Обсуждение результатов

При испытаниях на одноосное сжатие гранул сферической формы проявилось различие в механическом поведении ионитов в зависимости от ионной формы и концентрации внешнего раствора.

Для полиакрилового и полиметакрилового ионитов в Na-форме, набухших в воде, характерно упругое деформационное поведение. При нагрузке диаметр гранулы по оси сжатия уменьшается во времени, пока не установится постоянное для данной нагрузки значение. Это хорошо видно на графике зависимости деформации сферы по оси сжатия ($\Delta D_\tau/D_0 = (D_0 - D_\tau)/D_0$, где D_0 – исходный диаметр гранулы, D_τ – размер гранулы в момент времени τ по оси сжатия) от времени при периодическом нагружении и снятии нагрузки (рис. 2). С увеличением величины сжимающего усилия деформации пропорционально увеличиваются, но при этом остаются обратимыми после разгрузки. Остаточные (пластические или необратимые)

деформации не превышают 1 %, т. е. точности измерений линейных деформаций в используемом экспериментальном методе. Таким образом, набухшие в воде катиониты КБ-4П2 и КБ-2э3 в Na-форме являются типичными эластомерами с характерными упругими деформациями, т. е. полимерами в высокоэластическом состоянии.

Для таких набухших ионитов в широком диапазоне нагрузок зависимости установившихся деформаций $\varepsilon_\infty = (D_0 - D_\infty)/D_0$ (D_∞ – установившийся постоянный для данной нагрузки диаметр по оси сжатия) от величины усилия сжатия F нелинейны, но в области высоких нагрузок просматриваются линейные участки (рис. 3). Такая форма зависимости определяется сферической геометрией деформируемой частицы. Особенность деформирования сферической частицы при воздействии на нее груза с плоской поверхностью заключается в том, что площадь контакта в процессе деформирования изменяется и деформация сферы неоднородная [9]. Наиболее сильно деформируются участки сферы на периферии гранулы и в меньшей степени ближе к центру. При относительно малых нагрузках, когда площадь контакта невелика, деформация сильнее

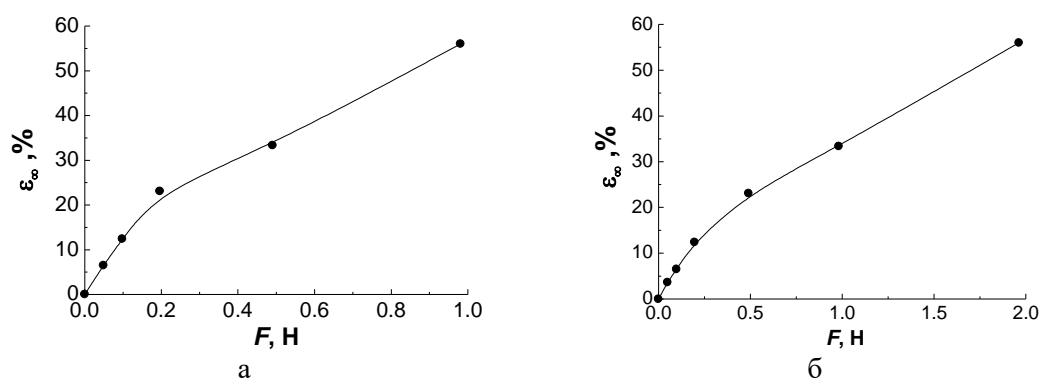


Рис. 3. Изохронные кривые деформаций сжатия ионитов КБ-2э3 (а) и КБ-4П2 (б) в Na-форме, построенные по результатам испытаний периодического деформирования.
Fig. 3. Isochronous compression curves of KB-2e3 (a) and KB-4P2 (b) ion-exchangers in Na-form, based on the results of periodic deformation tests

зависит от величины нагрузки и зависимость ϵ_{∞} от F круче, чем в области больших нагрузок. В то же время в области больших нагрузок, когда сферическая частица деформирована («сплющена») достаточно сильно, площадь контакта изменяется с нагрузкой относительно слабо и поэтому участок зависимости ϵ от F становится близким к линейному.

Для Са-формы ионита КБ-4П2 в разбавленном 0.005 н растворе CaCl_2 амплитуда деформирования оказалась достаточно большой, как и для Na-формы, но значительно больше, чем для Ni-формы (осевые деформации не превышают 10%), что говорит о значительно более жесткой структуре полимера в Ni-форме (рис. 4 а, б). Вероятно, это связано с тем, что по сравнению с Ca^{2+} у иона Ni^{2+} более ярко проявляется способность к образованию комплексных и хелатных соединений, свойственная всем переходным металлам. Ионный радиус Ni^{2+} (0.7 Å) меньше радиуса Ca^{2+} (0.94 Å) (помимо дефектности d -оболочки ионов никеля), поэтому увеличивается его поляризующее влияние и соответственно повышается прочность связи комплексообразующего иона никеля с функциональными группами катионита, в частности с карбоксилсодержащими ионитами [10].

В области небольших нагрузок, до 0.2 Н ионит КБ-4П2 в Са-форме ведет себя как эластомер с преобладанием упругих

деформаций, но при повышенных нагрузках становится заметным развитие деформаций, характерных для вязкоупругих материалов. Наблюдается плавное увеличение во времени общей деформации (рис. 5 а) и нелинейный характер изохронных кривых (рис. 5 а). Ионит КБ-4П2 в Ni-форме в разбавленных солевых растворах отличается невысоким уровнем упругих деформаций (не более 7%) даже при значительных усилиях сжатия (рис. 5 б), поэтому физическое состояние ионита, по-видимому, следует считать подобным стеклообразному состоянию ненабухших полимеров.

С увеличением концентрации внешнего раствора (CaCl_2 в одном случае и NiCl_2 в другом случае) под действием механической нагрузки на образец уменьшалась общая деформация гранулы КБ-4П2 в конце периода нагружения (рис. 4 в, г и 5 а, б), а также величина упругой деформации. При этом более ярко проявлялось вязкоупругое деформационное поведение таких набухших полимеров, когда мгновенно-упругие деформации уменьшаются, а остаточные (пластические) деформации увеличиваются.

Видно, что упруго-пластические свойства зависят от вида противоиона и концентрации раствора, которые оказывают влияние на влагосодержание ионита и на объем зерна ионита. Поглощение воды

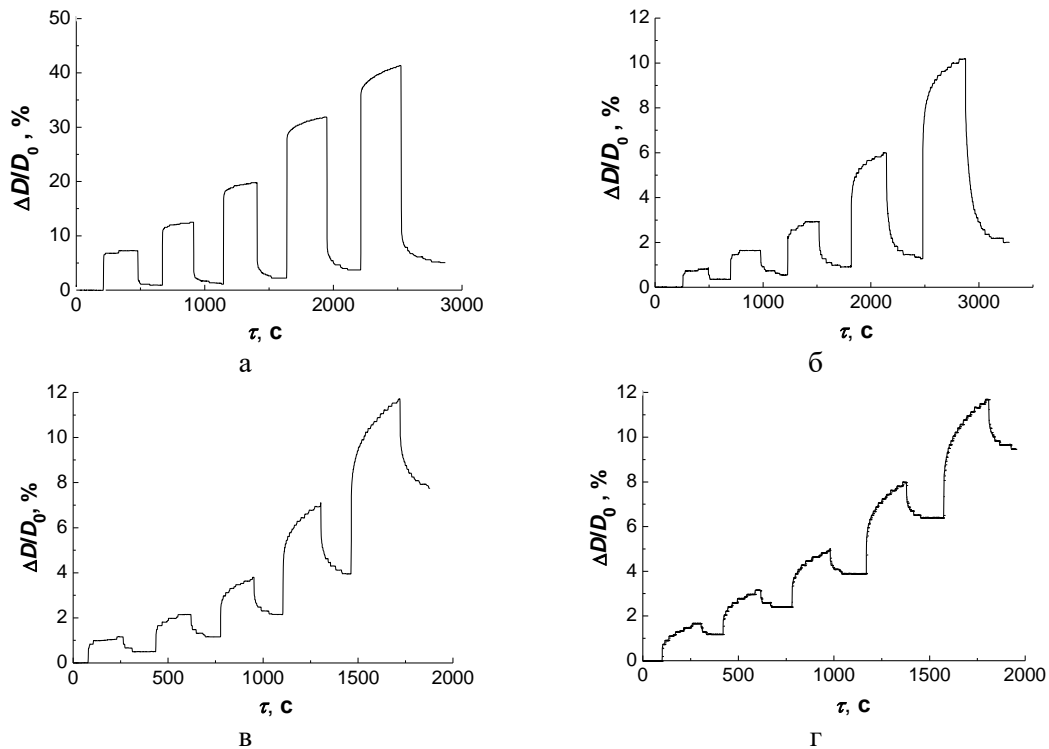


Рис. 4. Кривые изменения вертикального диаметра набухших сферических гранул ионитов и КБ-4П2 в Са-форме (а и в) и в Ni-форме (б, г) набухших в 0.005 н (а, б) и в 3.8 н (в, г) растворах хлоридов кальция и никеля соответственно, во времени при нагрузке (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 Н) и последующем снятии нагрузки.

Fig. 4. Curves of changes in the vertical diameter of spherical ion-exchanger granules of the KB-4P2 ionite in Ca-form (a and c) and in Ni-form (b, d) swollen in 0.005 n (a, b) and in 3.8 n (c, d) calcium and nickel chloride solutions, respectively, over time under load (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, and 1 N) and subsequent unload

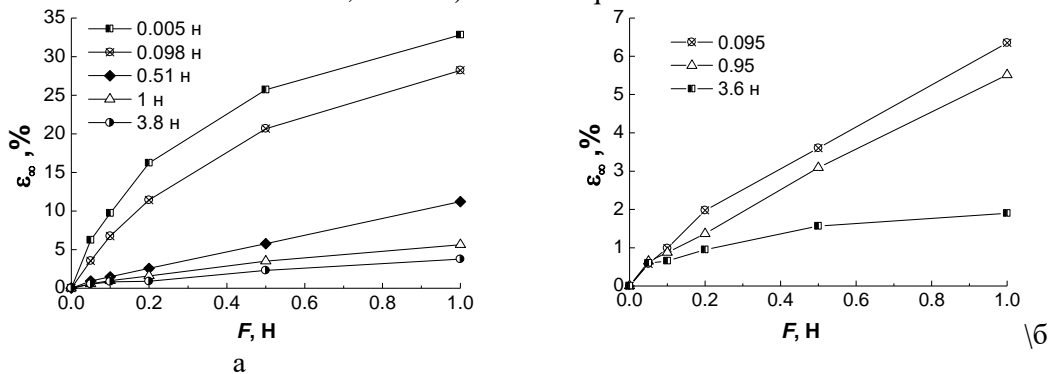


Рис. 5. Изохронные кривые деформаций сжатия ионита КБ-4П2 в Са- (а) и Ni-формах (б) для разных концентраций раствора

Fig. 5. Isochronous compression curves of the KB-4P2 ion-exchanger in Ca- (a) and Ni-forms (b) at different solution concentrations

ионитами исследовались во многих работах. Например, в книге [11] приведены данные, которые показывают, что катионит КБ-4П2 в Н-, Na- и Са- поглощает, соответственно, 6.93, 14.7 и 8.8 г-моль воды/г-экв ионита. В таблице приведены

наши результаты измерения относительных объемов зерен ионита КБ-4П2 в различных условиях.

Эти данные еще раз подтверждают известный факт, что перевод полиметакрилового катионита из натриевой формы в форму двухзарядного иона приводит к

Таблица 1. Относительные объёмы зерна ионита КВ-4П2 в различных условиях
 Table 1. Relative grain volumes of the KB-4P2 ion-exchanger under different conditions

R-Na		R-Ca		R-Ni		
сухое	в воде	0.005 н CaCl ₂	3.6 н CaCl ₂	0.005 н NiCl ₂	1.0 н NiCl ₂	3.6 н NiCl ₂
0.49	1.0	0.70	0.68	0.78	0.72	0.69

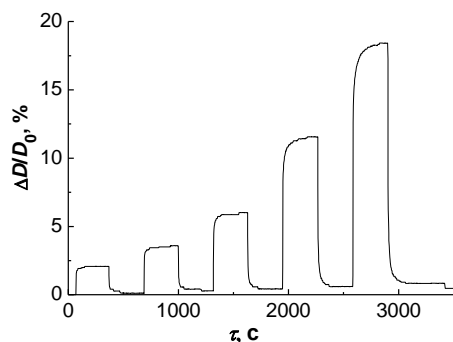


Рис. 6. Кривые изменения вертикального диаметра набухших в воде сферических гранул ионита КУ-2х8 в К-форме во времени при последовательной нагрузке (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 Н) и последующем снятии нагрузки

Fig. 6. Curves of changes in the vertical diameter of spherical granules of the KU-2x8 ionite swollen in water in K-form over time under successive load (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, and 1 N) and subsequent unload

значительному сжатию зерна. Увеличение концентрации раствора также снижает объем зерна, но уже слабее. Различие объема зерна в Са- и Ni-формах незначительное. Таким образом, в форме двухзарядных ионов жесткость полимера выше. При этом снижается величина деформации и медленнее происходят конформационные перестройки полимерной сетки под влиянием изменяющейся нагрузки (растет доля остаточных деформаций). Также наглядно проявляется и более высокая жесткость системы, существенно упрочненной более стабильными мостиками комплексов никеля: их способность к деформированию ниже, а доля остаточных деформаций выше, чем у ионитов в Са-форме.

Таким образом, в концентрированных растворах СаCl₂ и NiCl₂ ионит КВ-4П2 становится неупругим жестким материалом, для которого даже при повышенных

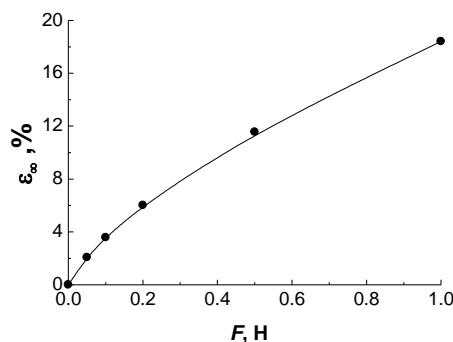


Рис. 7. Изохронная кривая деформаций сжатия ионита КУ-2х8 в К-форме в воде, построенная по результатам испытаний периодического деформирования.

Fig. 7. Isochronous compression curves of the KU-2x8 ionite in water, based on the results of periodic deformation tests

механических нагрузках величина упругих деформаций сжатия очень невелика. По-видимому, физическое релаксационное состояние таких ионитов аналогично переходному состоянию из высокоэластического в стеклообразное состояние полимеров с температурой стеклования, близкой к 20-30°C (вязкоупругие материалы).

Анализ деформационного поведения набухшего в воде катионита КУ-2х8 в К-форме показал, что для него также характерны упругие деформации, т.е. полимер находится в высокоэластическом состоянии, хотя и заметен вклад остаточных (пластических) деформаций (рис. 6). Однако полистирольная матрица более жесткая по сравнению с полиакриловыми и полиметакриловыми катионитами в форме иона щелочного металла, поэтому амплитуда деформирования существенно меньше. Изохронная кривая деформации также нелинейная (рис. 7). Для катионита

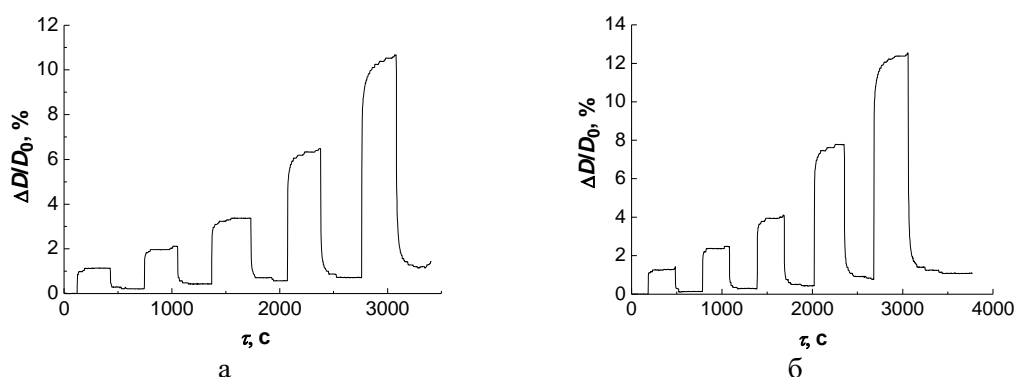


Рис. 8. Кривые изменения вертикального диаметра сферических гранул ионита КУ-2x8 (а) в Са-форме в воде и (б) Ni-форме в 0.1 н растворе NiCl₂ во времени при последовательной нагрузке (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 Н) и последующем снятии нагрузки.
 Fig. 8. Curves of changes in the vertical diameter of spherical granules of the KU-2x8 ion-exchanger (a) in Ca-form in water and (b) in Ni-form in 0.1 n NiCl₂ solution over time under successive load (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 N) and subsequent unload

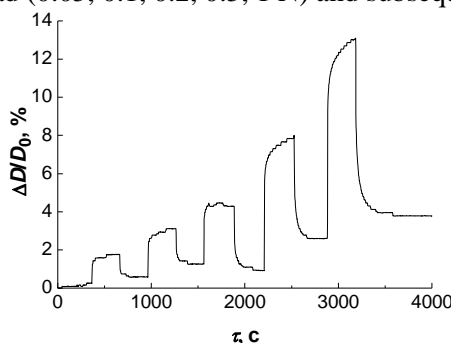


Рис. 9. Кривые изменения вертикального диаметра набухших в 3.6 н растворе NiCl₂ сферических гранул ионита КУ-2x8 во времени при последовательной нагрузке (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 Н) и последующем снятии нагрузки.
 Fig. 9. Curves of changes in the vertical diameter of spherical granules of the KU-2x8 ionite swollen in 3.6 n NiCl₂ solution over time under successive load (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, and 1 N) and subsequent unload

КУ-2x8 в Са- и Ni- формах даже в концентрированном растворе преобладающими остаются упругие деформации (рис. 8, 9).

Заключение

Таким образом, ионная форма полиакрилата и полиметакрилата, сшитых, соответственно, диметакрилатом триэтиленгликоля и дивинилбензолом, и концентрация внешнего раствора влияют на их упруго-пластические свойства. В разбавленных растворах хлорида натрия и хлорида кальция гели проявляют упругие свойства с близкими относительными амплитудами деформирования. При воздействии нагрузки амплитуда деформирования зерна полиметакрилата, сшитого ди-

винилбензолом, в Ni-форме в разбавленном растворе хлорида никеля значительно ниже, чем у Са-формы, со значительным вкладом пластической деформации. С увеличением концентрации внешнего раствора хлоридов кальция и никеля под действием механической нагрузки на зерно такого ионита уменьшается величина упругой деформации, а остаточные (пластические) деформации увеличиваются. В концентрированных растворах СаCl₂ и NiCl₂ такой ионит становится неупругим жестким материалом, для которого даже при повышенных механических нагрузках величина упругих деформаций сжатия очень невелика.



Для набухшего в воде сильнокислотного полистирольного катионита с привитыми сульфогруппами, сшитого дивинилбензолом, в К-форме также характерны упругие деформации, т. е. полимер находится в высокоэластическом состоянии. Однако полистирольная матрица более жесткая по сравнению с полиакриловыми и полиметакриловыми катионитами в форме иона щелочного металла, поэтому амплитуда деформирования существенно меньше. Для такого катионита

в Са- и Ni- формах даже в концентрированных растворах преобладающими являются упругие деформации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Zich L., Václavíková N. Characterization of ion exchange material behavior under pressure simulating electro-membrane cell conditions. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 2018; 62(2): 150-155.
2. Tiihonen J., Laatikainen M., Markkanen I., Paatero E. Sorption of neutral components in ion-exchange resins. 1. Effect of cross-link density and counterion on selective sorption of water-ethanol mixtures in sulfonated PS-DVB resins. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1999; 38(12): 4832-4842.
3. Tiihonen J., Markkanen I., Laatikainen M., Paatero E. Elasticity of ion-exchange resin beads in solvent mixtures. *J. Appl. Polym. Sci.* 2001; 82(5): 1256-1264.
4. Tiihonen J., Markkanen I., Kärki A., Äänismaa P., Laatikainen M., Paatero E. Modelling the sorption of water-ethanol mixtures in cross-linked ionic and neutral polymers. *Chem. Eng. Sci.* 2002; 57(11): 1885-1897.
5. Pastukhov A.V., Davankov V.A., Sidorova E.V., Shkol'nikov E.I., Volkov V.V. Deformation of styrene-divinylbenzene copolymers and hypercrosslinked polystyrenes during solvent adsorption and desorption. *Russ. Chem. Bull.* 2007; 56(3): 484-493.

6. Davankov V.A., Pastukhov A.V. Paradoxes of thermodynamics of aqua-vapor-polymer interface equilibrium. *Russian J. Phys. Chem. A.* 2011; 85(5): 721-729.
7. Davankov V.A., Pastukhov A.V. Paradoxes of thermodynamics of Swelling equilibria of polymers in liquids and vapors. *J. Phys. Chem. B.* 2011; 115(51): 15188-15195.
8. Karpyuk E.A., Titova O.I., Pastukhov A.V., Davankov V.A., Kargov S.I., Ivanov V.A. Complex formation of divalent cations with carboxylic acid resins as a factor determining different stationary states of their swelling. *Solv. Extr. Ion Exch.* 2016; 34(4): 362-374.
9. Butikov E.I., Bykov A.A., Kondrat'ev A.S. *Fizika v primerah i zadachah*. L., Izdvo Leningr. un-ta, 1983. 462 p. (In Russ.)
10. Hazel' M.Yu., Selemenev V.F., Slepцова O.V., Sockaya N.V. *Processy kompleksobrazovaniya v faze poliamfolitov pri sorbcii ionov nikelya iz slozhnyh mnogokomponentnyh rastvorov*. *Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya*. 2008; 1: 55-63.
11. Soldatov V.S. *Prostye ionoobmennye ravovesiya*. Minsk. Nauka i tekhnika. 1972. 224 p. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Е.А. Карпюк – к.х.н., доцент, химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

А.В. Пастухов – д.х.н., в.н.с., ИНЭОС РАН, Москва, Россия

E.A. Karpyuk – Doctor of Chemistry, Docent, Department of Chemistry M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: kat_il@mail.ru

A.V. Pastukhov – Doctor of Chemistry, Senior Scientist, Moscow, Russia, e-mail: avpast@gmail.com



О.Т. Гавлина – к.х.н., старший научный сотрудник, химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

С.И. Каргов – д.х.н., профессор, химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В.А. Иванов – д.х.н., профессор, химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

O.T. Gavlina – Doctor of Chemistry, Senior Scientist. Department of Chemistry M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: ogavlina@mail.ru

S.I. Kargov – Doctor of Chemistry, Professor. Department of Chemistry M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: skargov@yandex.ru

V.A. Ivanov – Doctor of Chemistry, Professor. Department of Chemistry M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: ivanov@phys.chem.msu.ru

Статья поступила в редакцию 25.03.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 25.03.2024; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 54.062

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12124

Экспресс-анализ ацетона в выдыхаемом воздухе при диагностике сахарного диабета

Игорь Артемьевич Платонов^{1✉}, Владимир Игоревич Платонов¹,
Ирина Николаевна Колесниченко¹, Олег Васильевич Родинков²,
Александр Сергеевич Брыксин¹, Астхик Эдиковна Маргарян¹,
Дмитрий Леонидович Колесниченко¹

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия, pia@ssau.ru[✉]

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Анализ выдыхаемого воздуха является активно развивающейся областью медицинской неинвазивной диагностики, поскольку такой вид анализа не предполагает инвазивных вмешательств и может проводиться многократно. Известно, что ацетон, содержащийся в выдыхаемом воздухе, коррелирует с уровнем глюкозы в крови и является биомаркером диабета. Использование в медицинских учреждениях аналитических систем для анализа ацетона в выдыхаемом воздухе позволит своевременно диагностировать патологические изменения уровня глюкозы в крови, проводить раннюю диагностику диабета и вести мониторинг эффективности терапии.

В настоящей работе показан экспресс-анализ ацетона в выдыхаемом воздухе с использованием мобильного диагностического комплекса на основе микрофлюидных систем, включающего газовый микрохроматограф «ПИА с термохимическим детектором, планарной хроматографической колонкой, термостатируемой системой пробоотбора и селективного улавливания мешающих компонентов, управляемого электрическими микроклапанами, автоматической системой дозирования с регулируемой продувкой от 0.1 до 5 сек и программным обеспечением. Предложена методика проведения анализа в диагностически значимом диапазоне концентраций: от 0.5 ppm до 20 ppm ацетона в выдыхаемом воздухе при диагностике диабета. Общее время анализа составляет 3 мин, время удерживания для ацетона 60 сек. Диагностический комплекс апробирован и позволяет напрямую определить ацетон в выдыхаемом воздухе. Применение системы улавливания и осушения демонстрирует отсутствие потери целевого вещества и позволяет добиться хорошей сходимости результатов, отклонение от опорного значения не превышает 10%. Апробация в натуральных условиях подтвердила данные, полученные на модельных смесях. Разработанный мобильный диагностический комплекс с автоматическим программируемым дозированием и методика количественного определения ацетона в ВВ (0.5-20 ppm) может быть рекомендована к использованию в клинических исследованиях в условиях медицинских учреждений.

Ключевые слова: газовая хроматография, неинвазивная диагностика, мобильный диагностический комплекс, микрофлюидные системы, биомаркеры, ацетон, диабет, выдыхаемый воздух.

Для цитирования: Платонов И.А., Платонов В.И., Колесниченко И.Н., Родинков О.В., Брыксин А.С., Маргарян А.Э., Колесниченко Д.Л. Экспресс-анализ ацетона в выдыхаемом воздухе при диагностике сахарного диабета // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 180-196. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12124>

Original article

Express analysis of acetone in exhaled air for diagnosing diabetes mellitus

Igor A. Platonov^{1✉}, Vladimir I. Platonov¹, Irina N. Kolesnichenko¹, Oleg V. Rodinkov²,
Alexander S. Bryksin¹, Asthik E. Margaryan¹, Dmitry L. Kolesnichenko¹

¹Korolev Samara National Research University, Samara, Russia, pia@ssau.ru[✉]

²St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia



Abstract. Exhaled air analysis is an actively developing area of medical non-invasive diagnostics, as it does not involve invasive interventions and can be performed repeatedly. It is known that acetone in exhaled air correlates with blood glucose and is a biomarker of diabetes. The use of analytical systems to analyse acetone in exhaled air in medical institutions will allow for the timely diagnosis of pathological changes in blood glucose levels, the early diagnosis of diabetes, and the monitoring of the effectiveness of treatments.

In this study, we described the express analysis of acetone in exhaled air using a mobile diagnostic complex based on microfluidic systems including a PIA gas microchromatograph with a thermochemical detector, a planar chromatographic column, a thermostatically controlled system for the sampling and selective capture of interfering components, operated by electric microvalves, and an automatic dosing system with adjustable blowdown from 0.1 to 5 sec and specialised software. We proposed using a diagnostically significant range of concentrations: from 0.5 ppm to 20 ppm of acetone in exhaled air in the diagnosis of diabetes. The total analysis time is 3 min, retention time for acetone is 60 sec. Testing of the complex confirmed that it allows for the direct determination of acetone in exhaled air. The use of the capture and drying system prevents the loss of the target substance and ensures good convergence of the results. The deviation from the reference value does not exceed 10%. Field testing confirmed the data obtained on model mixtures. The developed mobile diagnostic complex with automatic programmed dosing and the technique for the quantitative determination of acetone in exhaled air (0.5-20 ppm) can be recommended for use in clinical studies in medical institutions.

Keywords: gas chromatography, non-invasive diagnostics, mobile diagnostic complex, microfluidic systems, biomarkers, acetone, diabetes, exhaled air.

For citation: Platonov I.A., Platonov V.I., Kolesnichenko I.N., Rodinkov O.V., Bryksin A.S., Margaryan A.E., Kolesnichenko D.L. Express analysis of acetone in exhaled air for diagnosing diabetes mellitus. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2024. 24(2): 180-196. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12124>

Введение

Развитие методов неинвазивной диагностики в том числе анализа компонентов выдыхаемого воздуха (ВВ) в последние 10 лет переживает значительный подъем. Такие успехи стали возможны благодаря интенсивному развитию аналитического приборостроения, снижению пределов обнаружения аналитов и созданию селективных аналитических систем. Выдыхаемый воздух несет в себе информацию о протекающих в организме метаболических процессах, маркерами которых являются летучие соединения и ряд нелетучих соединений, растворенных в конденсате. Таких соединений насчитывается порядка 3500, но только некоторые из них могут быть диагностически значимыми, поскольку известны их метаболические пути образования [1-9]. Диагностическая применимость также определяется совокупностью факторов, которые обусловлены в том числе и аналитическими возможностями методов и средств измерений: корреляция с патологическим состоянием должна быть клинически подтверждена независимыми методами, диапазон концентраций для

нормы и патологии должен быть определено выше суммарной расширенной неопределенности метода анализа, которая не должна превышать 20%.

Методы и подходы, используемые для обнаружения биомаркеров в ВВ, можно разделить на несколько групп: индивидуальный покомпонентный анализ и групповое определение (фингерпринт, метаболический профиль). Для индивидуального покомпонентного анализа чаще всего используют методы газовой хроматографии (ГХ) [10-18], хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) [19-24], протонная масс-спектрометрия (PTR-MS) [25-31], спектрометрия ионной подвижности [26-28], масс-спектрометрия выбранных ионов в потоке (SIFT-MS) [23, 29-31], селективные сенсоры [32-38]. Системы типа «электронный нос» также получили свое широкое распространение [39-42] благодаря развитию сенсорных технологий, что сделало оформление метода более компактным и доступным. Подход группового анализа предполагает анализ некой совокупности летучих соединений в ВВ: это может быть диагностическая группа соединений, метаболически связанных друг с другом, по совокупному присутствию которых или соотношению

может быть сделано заключение о состоянии здоровья. Другой подход основан на алгоритме распознавания образов (фингерпринт) и составлении индивидуального метаболического профиля, по изменению которого можно судить о протекающих метаболических процессах. В любом из описанных подходов используют физико-химические методы анализа. Среди летучих соединений в ВВ выделяют порядка ста диагностически значимых биомаркеров, содержание которых коррелирует с клиническими проявлениями заболевания: водород, оксид углерода, оксид азота, сероводород, аммиак, метан, пентан, изопрен, ацетон, альдегиды, спирты, короткоцепочечные жирные кислоты и т.д. Оснащение медицинских учреждений аналитическими системами для анализа ВВ позволит своевременно проводить выявление сердечно-сосудистых, эндокринных и воспалительных нижних дыхательных путей, отслеживать динамику и эффективность терапии, выявлять факторы риска развития осложнений и ранней диагностики при диспансеризации и профилактических осмотрах. Среди диагностируемых заболеваний и функциональных нарушений - диабет, ацидоз, кетоз, сердечная недостаточность, астма, ХОБЛ, воспалительные заболевания легких аллергической и инфекционной этиологии, оксидативный стресс, нарушение липидного обмена, СИБР, воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта. Некоторые из них имеют четкую корреляцию с биохимическими показателями крови (например ацетон в ВВ и уровень глюкозы в крови), другие помогают выявить природу заболевания и определить путь терапии (так например оксид азота используется для выбора тактики лечения, дифференциации диагноза и определения необходимости применения длительной ингаляционной терапии кортикостероидами [43]) или группы биомаркеров, по

которым проводят уточнение или дифференциацию диагноза (например альдегиды, метан, пентан, этан, водород).

Количественное определение индивидуальных биомаркеров в ВВ сопряжено с рядом трудностей. Поскольку концентрация биомаркеров в ВВ обычно находится на уровне ppb (одна часть на миллиард) и менее, то такие низкие концентрации ограничивают возможности прямого экспрессного анализа и требуют дополнительного концентрирования [44-52]. Представительный пробоотбор предполагает исключение возможности загрязнения пробы экзогенными летучими веществами атмосферного воздуха, поэтому отбор пробы смешанного экспираторного воздуха значительно снижает достоверность анализа, предпочтителен отбор альвеолярного воздуха, который в большей степени отражает объективную картину газообмена в легких [53]. Наиболее распространенная методология пробоотбора [54, 55] предполагает отбор пробы в мешки из инертных полимерных материалов типа Tedlar, которые удобны в использовании, пригодны для хранения пробы. Однако стоит отметить ряд неоспоримых недостатков такого метода: при отборе пробы происходит разбавление альвеолярного воздуха, при том, что объем мешка не калиброван, то оценить достоверно такое разбавление не представляется возможным, что при работе с концентрациями биомаркеров на уровне ppm и ppb значительно повышает вклад случайных факторов в суммарную неопределенность результата измерения. Вторым фактором является конденсация паров воды, которая в ВВ может содержаться порядка 6-7% [56]; для её устранения необходимо использовать дополнительные осушители на входе и термостатирование всей системы до 37-38°C. В совокупности с необходимостью определения расхода и дополнительной оснасткой датчиком расхода данная система кроме громоздкости становится и экономически



нецелесообразной. Аналогичная ситуация с газонепроницаемыми стеклянными шприцами, при этом еще имеет место многоступенчатая процедура отбора и переноса пробы в вакуумированные пробирки. На всех этапах неизбежно возникают артефакты, которые крайне затруднительно оценить количественно. Те же проблемы возникают при хранении проб: несмотря на то, что производители мешков для ВВ указывают интервалы хранения 8-24 часа при потере не более 5%, на практике из-за указанных выше причин, хранение более 1-3 часов приводит к искажению результата, даже при точном соблюдении условий хранения. Таким образом, несмотря на простоту и доступность этих устройств, при детальной оценке их целесообразность применения значительно снижается. Одним из эффективных решений являются дыхательные пробоотборники, основанные на твердофазной микроэкстракции и сорбции на составные сорбенты [57-62]. Применение таких пробоотборников и последующего анализа методом ГХ-МС позволяет широко использовать их для клинических исследовательских целей, но высокая себестоимость такого анализа ограничивает доступность ее для массового применения в качестве персонифицированных методов медицины. В связи с вышесказанным, наиболее целесообразным решением является экспресс-анализ альвеолярного воздуха, исключаящий необходимость отбора пробы и хранения, и позволяющий в короткий срок в режиме реального времени осуществлять количественное определение биомаркеров в ВВ. Неоспоримым преимуществом при этом обладают портативные приборы [63-67]. Однако такое решение возможно только при наличии технической возможности миниатюризации аналитической системы без ухудшения ее метрологических характеристик [68-71].

В настоящей работе рассматривается возможность прямого газохроматографического определения ацетона в ВВ при

скрининге диабета. Известно, что ацетон в ВВ является биомаркером диабета [4, 14, 17, 26, 30, 32, 36, 37, 72-74]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения в мире 422 миллиона взрослых страдают диабетом, и 1.6 миллиона смертей ежегодно напрямую связаны с диабетом [75, 76]. Кроме того, развитие диабета определено как одно из наиболее опасных осложнений после Ковид-19. Ранняя диагностики и выявление факторов риска развития заболевания являются залогом успешной терапии, а в ряде случаев принятием превентивных мер и недопущением развития жизнеугрожающих состояний. Диагностический диапазон для ацетона как биомаркера диабета составляет 0.2-25 ppm. По различным источникам граница нормы здорового человека и патологии варьируются, усредненно: норма здорового человека 0.2-0.9 ppm, более 0.9 ppm считается группой риска. Содержание ацетона в ВВ более 2 ppm свидетельствует о развитии диабета, превышение 10 ppm – жизнеугрожающие состояния. По мнению авторов [76, 77] содержание ацетона в ВВ находится в диапазоне 0.2-1.8 ppm для здоровых людей и в диапазоне 1.25-2.5 ppm для людей с диабетом. Некоторые источники приводят данные, что уровень ацетона может увеличиваться до 25 частей на миллион при диабете 1 типа [77]. Авторы работы [18.] приводят данные о средней концентрации ацетона в ВВ здоровых людей, равной 0.477 ppm, для больных диабетом первого типа среднее значение на уровне 2.19 ppm, а абсолютные значения находятся в пределах от 0.15-2.74 ppm. Уточнение диагностических диапазонов ограничивается доступностью этих методов и оборудования для широких клинических исследований. Кроме того, необходимо понимать, что выставление диагноза по только одному показателю некорректно, поскольку концентрация биомаркера может быть связана со многими факторами, такими как сопутствующие заболевания, диета, уровень физических упражнений,

загрязнение окружающей среды, вредные привычки, состояние полости рта и т. д. В медицинской практике при обнаружении отклонения значения от показателей условной нормы, необходимо данные соотносить с общей клинической картиной и концентрацией глюкозы в крови, как реперной точкой, но неоспоримым преимуществом при динамическом наблюдении и оценке эффективности терапии обладает неинвазивный анализ в режиме реального времени.

Как известно, по литературным данным для экспресс-определения ацетона в выдыхаемом воздухе наиболее часто применяют методы газовой хроматографии, сенсоры и микродатчики. Сенсоры отличаются высокой чувствительностью и селективностью, в работе [4] приведен подробный обзор технологий их изготовления. Современные МЭМС-детекторы, применяемые в газовой хроматографии, также могут обеспечить достаточный предел детектирования для прямого определения ацетона при соблюдении двух условий: 1) правильный отбор пробы – порции альвеолярного воздуха без загрязнения атмосферным или смешанным воздухом из верхних дыхательных путей; 2) устранение мешающих компонентов и паров воды. Эти ограничения справедливы как для сенсоров, так и для метода газовой хроматографии.

Целью настоящей работы являлась разработка мобильного диагностического комплекса на основе микрофлюидных систем, оснащенного системой автоматического отбора пробы, для экспрессного количественного определения ацетона в выдыхаемом воздухе при диагностике сахарного диабета.

Экспериментальная часть

Мобильный диагностический комплекс на основе микрофлюидных систем включает в себя газовый микрохроматограф «ПИА» (номер в Госреестре средств измерений 60785-15) с термохимическим

детектором, планарной хроматографической колонкой, термостатируемой системой пробоотбора и селективного улавливания мешающих компонентов, управляемого электрическими микроклапанами, автоматической системой дозирования с регулируемой продувкой от 0.1 до 5 сек и программным обеспечением. Суммарные габаритные размеры комплекса, включая необходимую для проведения анализа периферию, составляют $20 \times 15 \times 7$ см, вес 2 кг. Совокупный вес со всеми дополнительными устройствами, газовыми баллонами и аккумулятором составляет около 8 кг.

Планарная хроматографическая колонка имеет каналы длиной 1 м, внутренним сечением 0.8 мм^2 , заполненными сорбентом Carborack В (фракция 80-100 МЭШ). Температура термостата колонок 60°C , давление 75 кПа. Общее время анализа составляет 3 мин, время удерживания для ацетона 60 сек, предел детектирования по ГОСТ 8.485-2013 составляет 0.3 ppm. В состав комплекса входит также методика проведения анализа в диагностически значимом диапазоне концентраций: от 0.5 ppm ацетона в выдыхаемом воздухе до 20 ppm при диагностике диабета, расширенная неопределенность для нижнего диапазона не превышает 20%. Диапазон определяемых концентраций был выбран, исходя из всего спектра данных о норме и патологии для ацетона в ВВ, имеющих в литературе. На рис. 1 представлен мобильный диагностический комплекс для экспрессного количественного определения ацетона в выдыхаемом воздухе.

Система пробоотбора оснащена термостатируемым мундштуком, поддерживающим температуру $37^\circ\text{C} \pm 0.5\%$ и системой селективного улавливания паров воды, управляемого электрическими микроклапанами в автоматическом режиме, заданном с помощью программного обеспечения. Объем пробы 250 мкл, продувка



Рис. 1. Мобильный диагностический комплекс на основе микрофлюидных систем, оснащенный системой автоматического отбора пробы для экспрессного количественного определения ацетона в выдыхаемом воздухе при диагностике диабета

Fig. 1. Mobile diagnostic complex based on microfluidic systems equipped with an automatic sampling system for the rapid quantitative determination of acetone in exhaled air to diagnose diabetes

5 сек (100 см^3). Устройство аналитической системы позволяет проводить анализ ацетона в выдыхаемом воздухе напрямую, без промежуточных этапов отбора, хранения, концентрирования.

Принцип работы аналогичен трубке Холдейна, система представляет собой проточный контейнер. Общие конструкционные особенности системы пробоотбора: термостатируемый мундштук, внутрь которого помещена трубчатая система индивидуального применения, содержащая селективный влагоулавитель на основе безводного KF, который в отличие от CaCl_2 и $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ не удерживает ацетон и другие полярные органические соединения [78].

В качестве модельных смесей с содержанием ацетона 1 ppm использовались ПГС 10385-2013 (ООО «Мониторинг»). В аналогичных условиях готовились модельные смеси 1 ppm в мешках из инертного полимерного материала Tedlar объемом 1 дм^3 .

Обсуждение результатов

В целях определения целесообразного способа приготовления градуировочных смесей было проведено сравнение характеристик стабильности и однородности по ГОСТ Р 50.2.058-2007, для газовых смесей, приготовленных в мешках из полимерных материалов объеметрическим методом (система 1), анализ равновесной паровой фазы с использованием

дистиллированной воды для приготовления раствора (система 2), смеси, приготовленной методом добавки, в мешках Tedlar (система 3). В качестве образца сравнения использовались аттестованные газовые смеси с содержанием ацетона 1 ppm (ПГС 10385-2013) (система 4). Оценку характеристик однородности и стабильности при использовании предлагаемого устройства автоматического дозирования пробы проводили путем пропускания модельной смеси с содержанием ацетона 1 ppm (ПГС 10385-2013) (система 5) через систему с осушителем и при использовании смеси, приготовленной методом добавки к реальной пробе (система 6), хромато-десорбционным способом по методике, описанной [74, 79] (система 7). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных неопределенность от факторов однородности и стабильности для модельных смесей, приготовленных в мешках для ВВ значительно превышает аналогичные характеристики для ПГС 10385-2013. Поскольку к модельным смесям предъявляются требования, аналогичные калибровочным образцам, то в случае применения мешков для отбора проб, хранения и приготовления смесей необходимо использовать их непосредственно после

Таблица 1. Сравнительная оценка способов приготовления градуировочных смесей при количественном определении ацетона в ВВ

Table 1. Comparative evaluation of methods for preparing calibration mixtures for the quantitative determination of acetone in exhaled air

№ системы	Концентрация ацетона в газовой смеси, ppm		Однородность ¹ , %	Стабильность, при $\tau=2/4/6/8$ ч, %	Неопределенность процедуры приготовления ³ , %
	Расчетное значение	Определенное значение			
1	1.0	0.8	8	5/12/18/32	8
2	1.2	0.8	10	– ²	30
3	1.3	1.1	5	2/10/20/30	15
4	1.0	–	1	1/1/1/1	– ⁴
5	1.0	1.0	1	1/1/1/1	– ⁴
6	–	0.9	15	10/15/24/35	15
7	–	1.1	2	2/2/3/3	6

¹оценку однородности проводили при $n=12$, пороговое значение суммарной неопределенности МВИ принимали равным 20%; ²метод не предполагает хранение проб, стабильность при хранении матричных растворов не исследовалась; ³расчет значения неопределенности процедуры приготовления проводили по ГОСТ 50.2.058-2007 с учетом вкладов всех стадий приготовления, при идентичных средствах измерения и средствах дозирования; ⁴данные о неопределенности процедуры приготовления отсутствуют, относительная расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k=2$ не превышает 5% согласно описанию типа ПГС 10385-2013 (приложение к свидетельству №3560 об утверждении типа стандартного образца).

приготовления или не более, чем в течение часа. Для приготовления стандартных газовых смесей для калибровки газохроматографического оборудования также могут быть рекомендованы хромато-десорбционный метод, суммарная неопределенность которого составляет 10%, хромато-мембранный метод [80] – 6.7%, метод, реализованный в парофазном источнике [17] – 7%, однако стоит учитывать, что данные по значениям константы распределения ацетона в системе вода-пар в различных источниках отличаются на 30-50% при одинаковых температурных условиях [81-83], а в натуральных условиях при отклонении от заданных параметров это значение будет непрогнозируемо отличаться, что будет значительно увеличивать суммарную неопределенность аттестованного значения ацетона, и, следовательно, влиять на достоверность анализа. Все отмеченные особенности необходимо учитывать при планировании эксперимента, для минимизации случайных факторов. Для хранения проб целесообразно применять сорбционные

системы, оценка эффективности по сравнению с хранением проб в мешках показана в работе [84]. Прямое дозирование при этом демонстрирует отсутствие потери целевого вещества как на примере газовых смесей ПГС 10385-2013, так и смесей, приготовленных методом добавки (система 3 при условии хранения не более чем 2 часа). В этом случае однородность определяется исключительно вкладом систематической погрешности, соответствующей СКО сигнала детектора. Предел детектирования по ацетону составляет 0.3 ppm. Как видно из представленных данных, значения при 1 ppm для прямого дозирования не превышают 10%.

В таблице 2 представлен сравнительный анализ различных способов отбора и дозирования пробы методом «введено-найдено», относительно добавки известного количества ацетона 0.5 ppm. В случае прямого дозирования использовалась модельная смесь влажного воздуха (6%) с содержанием ацетона 1 ppm. Данные приведены для 10 параллельных проб. Во

Таблица 2. Сравнительный анализ различных способов отбора и дозирования пробы
 Table 2. Comparative analysis of different methods of sampling and sample dosing

Способ отбора пробы и дозирования	Экспериментально найденная концентрация ацетона, ppm	Максимальный разброс значений в выборке, n=10, %	Отклонение значения «введено-найденно», %
Мешок Tedlar с 1 клапаном	0.6	выброс 50%* 60**	–
Мешок Tedlar с 2 клапанами	0.6	выброс 10%* 40**	–
Прямое дозирование без системы осушителя	0.8	10	20
Прямое дозирование с системой осушителя	1.1	2	10

* в 5 из 10 случаев концентрация ацетона ниже предела детектирования, сигнал детектора не превышал двух значений уровня шума; ** данные приведены для определяемых значений в пределах от 0.5 ppm, n=5, что составило 50% от общего числа проб.

всех случаях использовалось автоматическое программируемое дозирование.

Как видно из представленных данных, при отборе проб в мешки наблюдается занижение результатов, кроме того, в 5 из 10 случаев концентрация ацетона была ниже 0.5 ppm, что может быть обусловлено значительном разбавлением пробы за счет смешанного или атмосферного воздуха и нарушения техники отбора пробы. Кроме того, в этом случае может иметь место загрязнение экзогенными летучими органическими соединениями из атмосферного воздуха, что также может приводить к неверной интерпретации результатов. В случае применения устройства для прямого анализа потери целевого компонента не наблюдается, однако при отсутствии осушителя в 3 из 10 случаев визуально фиксировались капли конденсата на коммуникациях. Полярные соединения и ацетон в том числе могут концентрироваться в каплях конденсата, вследствие чего имеет место занижение определяемой концентрации ацетона. Такое закономерное снижение результата определения было зафиксировано для соответствующих проб группы с прямым дозированием без осушителя. В случае использования автоматической термостабируемой системы для ввода пробы с осушителем фторидом калия таких мешаю-

щих факторов не зафиксировано, отклонение от опорного значения не превышает 10%.

Мобильный диагностический комплекс на основе микрофлюидных систем, оснащенный системой автоматического отбора пробы для экспрессного количественного определения ацетона в выдыхаемом воздухе и методика были апробированы в лабораторных условиях. Отбор проб выдыхаемого воздуха проводили в соответствии с общепринятыми требованиями локально-этического комитета, отбор проводили натощак и после 4 часового перерыва после приема пищи, фиксировали наличие вредных привычек (курение), наличие функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта, наличие особенностей питания (кетодиеты), семейный анамнез и наличие сахарного диабета у близких родственников 1-2 линии. Проводили три параллельных измерения с интервалом отбора 3 минуты, дыхание не форсированное. На рисунке 2 представлена типовая хроматограмма, полученная методом наложения сигнала для нормы, пациента из группы риска. Как видно из рисунка, профиль пика во всех случаях имеет симметричный вид, близкий к нормальному распределению, и имеет место как минимум двукратное отклонение амплитуды сиг

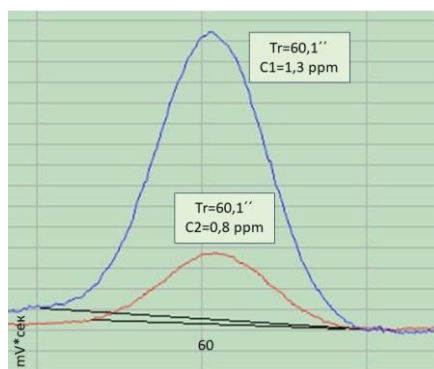


Рис. 2. Хроматограмма, полученная методом наложения сигнала для нормы и группы риска
 Fig. 2. Chromatogram obtained by superimposing the norm and risk group signals

Таблица 3. Результаты апробации мобильного диагностического комплекса на основе микрофлюидных систем, оснащенного системой автоматического отбора пробы для экспрессного количественного определения ацетона в реальных пробах ВВ

Table 3. Results of testing of the mobile diagnostic complex based on microfluidic systems, equipped with an automatic sampling system for the express quantitative determination of acetone in real samples of exhaled air

Характеристики групп здоровья		Концентрация ацетона в ВВ, ppm/число выбросов среди числа измерений n=3		
		Предлагаемый способ	Мешок Tedlar с 1 клапаном	Мешок Tedlar с 2 клапанами
Вредные привычки (курение)	Электронные сигареты	0.8/0	<0.3	0.6/0
	Обычные сигареты	60.9/0	<0.3	0.6/0
Функциональные нарушения ЖКТ		0.8/0	<0.3	0.6/0
Тип питания (наличие кетодиеты)		1.2/0	0.6/1	0.8/1
Без диабета в семейном анамнезе		0.9/0	<0.3	0.6/0
Диабет у 1 линии родственников		1.3/0	0.6/1	0.8/0
Диабет у 2 линии родственников		1.0/0	<0.3	0.7/1

нала (площадь пиков 60 и 112 усл.ед. соответственно), что позволяет достаточно четко дифференцировать результат «норма – группа риска – патология».

В таблице 3 представлены экспериментальные результаты апробации мобильного диагностического комплекса на основе микрофлюидных систем, оснащенного системой автоматического отбора пробы для экспрессного количественного определения ацетона в реальных пробах ВВ. Время анализа составило 3 минуты, время удерживания ацетона 60 сек. Как видно из представленных данных на рис. 2, время анализа может быть сокращено за счет увеличения скорости газа-носителя, а лимитирующей стадией

является продувка системы до и после анализа.

Установлено, что при отборе проб в мешки, происходит значительное разбавление альвеолярного воздуха за счет смешанного экспираторного воздуха, как в случае мешков с одним клапаном, так и двумя клапанами. В случае с двумя клапанами это значение несколько ниже (2%), однако отбор пробы требует форсированного выдоха. Стоит отметить, что при отборе проб в мешки с 1 клапаном наблюдался результат ниже предела детектирования, сигнал детектора не превышал двух значений уровня шума, в то время как для этой же группы другими методами были зафиксированы значения



от 0.6 до 0.9 ppm, кроме того имела место нестабильная воспроизводимость результатов – из 3 параллельных измерений 1 выброс, что наблюдалось также и для модельных смесей (таблица 3). Аналогичная картина имеет место при использовании мешков с двумя клапанами. Кроме того, в этом случае может иметь место загрязнение экзогенными летучими органическими соединениями из атмосферного воздуха, что также может приводить к неверной интерпретации результатов. Для количественной оценки при таком пробоотборе необходимо проводить большее количество параллельных измерений и проводить дополнительное концентрирование. Указанные приемы позволяют получить более объективный результат, однако значительно более трудоёмки и экономически затратны. Кроме того, все дополнительные этапы (отбор, хранение, концентрирование) вносят дополнительную погрешность и их суммарный вклад случайной составляющей превысит 20%, что значительно снижает диагностическую значимость метода при оценке состояния здоровья. В случае экспресс-анализа с использованием мобильного диагностического комплекса с автоматическим программируемым дозированием суммарная погрешность анализа определяется преимущественно систематической погрешностью средства измерения и погрешностью аттестованного значения градуировочных смесей, минимальным из рассмотренных является ПГС 10385-2013. Соизмеримыми характеристиками обладает хроматомембранный метод получения газовых смесей 6.7% [81] и хромато-десорбционный метод – 10%.

Заключение

Современные газохроматографические приборы демонстрируют высокие аналитические качества с точки зрения чувствительности, селективности и экспрессности анализа. Внедрение МЭМС-

технологий для изготовления систем детектирования, разделения, управления потоками газа обеспечивают миниатюризацию газохроматографических аналитических комплексов и расширение возможности их применения для неинвазивной диагностики и создания устройств персонализированной медицины. Для прямого определения биомаркера сахарного диабета был разработан и апробирован мобильный диагностический комплекс на основе микрофлюидных систем, оснащенный системой автоматического отбора пробы. В мобильный диагностический комплекс входит газовый микрохроматограф «ПИА» (номер в Госреестре средств измерений 60785-15) с термохимическим детектором, планарная хроматографическая колонка (длина 1 м, внутреннее сечение капала 0.8 мм², заполненная сорбентом Carborack B (фракция 80-100 МЭШ), термостатируемая система автоматического пробоотбора и селективного улавливания мешающих компонентов, управляемого электрическими микроклапанами, автоматической системой дозирования с регулируемой продувкой от 0.1 до 5 сек и программным обеспечением. Суммарные габаритные размеры комплекса, включая необходимую для проведения анализа периферию, 20×15×7 см, вес 2 кг. В состав комплекса входит также методика проведения анализа в диагностически значимом диапазоне концентраций: от 0.5 ppm ацетона в выдыхаемом воздухе до 20 ppm при диагностике диабета. Общее время анализа составляет 3 мин, время удерживания для ацетона 60 сек.

Методика анализа предполагает вариант выбора наиболее оптимального способа калибровки. Сравнительная оценка различных способов получения калибровочных газовых смесей показала, что по характеристикам суммарной неопределенности аттестованного значения наиболее целесообразно использование поверочных газовых смесей ПГС 10385-

2013 (менее 5%), соизмеримыми характеристиками обладает хроматомембранный метод получения газовых смесей 6.7% и хромато-десорбционный метод – 10%. Сравнение методов отбора пробы и хранения демонстрируют ограничения по применению широко тиражируемого способа отбора проб ВВ в мешки Tedlar, поскольку в данном случае происходит неконтролируемое разбавление альвеолярного воздуха смешанным или атмосферным воздухом при отборе пробы. Некоторым преимуществом (2%) обладают мешки Tedlar с двумя клапанами, однако хранение пробы в любом типе мешков более 2 часов не целесообразно из-за значительной потери целевого компонента и как следствие занижение результатов измерений. Кроме того, все дополнительные этапы (отбор, хранение, концентрирование) вносят дополнительную погрешность и их суммарный вклад случайной составляющей превысит 20%, что значительно снижает диагностическую значимость метода при оценке состояния здоровья.

В случае экспресс-анализа с использованием мобильного диагностического комплекса с автоматическим программируемым дозированием суммарная погрешность анализа определяется преиму-

Список литературы/References

1. Phillips M. Breath test in medicine. *Sci. Am.* 1992; 267: 74-79.
2. Phillips M. Method for the Collection and Assay of Volatile Organic Compounds in Breath. *Analytical Biochemistry.* 1997; 247(2): 272-278.
3. Stepanov E.V. Metody vysokochuvstvitelnogo gazovogo analiza molekulyarnykh biomarkerov v issledovaniyah vydyhaemogo vozduha. *Trudy Instituta obshchej fiziki im. A.M. Prohorova.* 2005; 61: 5-47. (In Russ.)
4. Sagnik Das, Mrinal Pal. Non-Invasive Monitoring of Human Health by Exhaled Breath Analysis: A Comprehensive

и систематической погрешностью средства измерения и погрешностью аттестованного значения градуировочных смесей. Применение системы улавливания и осушения демонстрирует отсутствие потери целевого вещества и позволяет добиться хорошей сходимости результатов, отклонение от опорного значения не превышает 10%. Апробация в натуральных условиях подтвердила данные, полученные на модельных смесях. Общие диагностические диапазоны совпадают с литературными данными. Значимых отклонений результатов из-за внешних факторов в выбранной группе не обнаружено. Разработанный мобильный диагностический комплекс с автоматическим программируемым дозированием и методика количественного определения ацетона в ВВ (0.5-20 ppm) может быть рекомендована к использованию в клинических исследованиях в условиях медицинских учреждений.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Review. *Journal of The Electrochemical Society.* 2020; 16(3): 037562.

5. Kopylov F.Yu., Syrkin A.L., Chomahidze P.Sh., Bykova A.A., Shaltaeva Yu.R., Belyakov V.V., Pershenkov V.S., Samotaev N.N., Golovin A.V., Vasil'ev V.K., Malkin E.K., Gromov E.A., Ivanov I.A., Lipatov D.YU., YAKovlev D.YU. Perspektivy diagnostiki razlichnykh zabolevanij po sostavu vydyhaemogo vozduha. *Klinicheskaya medicina.* 2013; 10: 16-21. (In Russ.)
6. Shcherbakova N.V., Nacharov P.V., Yanov Yu.K. Analiz gazovogo sostava vydyhaemogo vozduha v diagnostike zabolevanij. *Ros. otorinolaringologiya.* 2005; 4(17): 1260-32. (In Russ.)



7. Gorbunov I.S., Gubal' A.R., Ganeev A.A., Rodinkov O.V., Karcova L.A., Besonova E.A., Arsen'ev A.I., Nefedov A.O., Kraeva L.A. Optimizaciya uslovij analiza vydyhaemogo vozduha metodom gazovoj hromatografii–mass-spektrometrii dlya celej neinvazivnoj diagnostiki raka legkih. *ZHurnal analiticheskoy himii*. 2019; 74(11): 870-880.
8. Gashimova E.M., Temerdashev A.Z., Porhanov V.A., Polyakov I.S., Perunov D.V. Letuchie organicheskie soedineniya v vydyhaemom vozduhe kak biomarkery raka legkih. Dostizheniya i vozmozhnye problem. *ZHurnal analiticheskoy himii*. 2022; 77(7): 585-615. (In Russ.)
9. Ganeev A.A., Gubal A.R., Lukyanov G.N. etc. Analysis of exhaled air for early-stage diagnosis of lung cancer: opportunities and challenges. *Russ Chem Rev*. 2018; 87(9): 904-921. (In Russ.)
10. Buszewski B., Keszy M., Ligor T., Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr*. 2007; 21(6): 553-566.
11. Amann A., Španěl P., Smith D. Breath Analysis: The Approach Towards Clinical Applications. *Mini Rev Med Chem*. 2007; 7(2): 115-129.
12. Issitt Th., Wiggins L., Veysey M., Sweeney S. T., Brackenbury W. J., Redeker K. Volatile compounds in human breath: critical review and meta-analysis. *Journal of Breath Research*. 2022; 16(2): 024001.
13. Miekisch W., Schubert J.K., Noldge-Schomburg G.F.E. Diagnostic potential of breath analysis-focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta*. 2004; 347(1-2): 25-39.
14. Platonov, I. A., Kolesnichenko, I. N., Pavlova, L. V., Muhanova, I. M., & Platonov, V. I. A mobile diagnostics suite for the express quantitative determination of acetone in exhaled breath. *Sorbtionnyye I Khromatograficheskie Protsessy*, 2022; 22(4): 365-376. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10563> (In Russ.)
15. Deng C., Zhang J., Yu X., Zhang W., Zhang X. Determination of acetone in human breath by gas chromatography-mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *J. Chromatogr. B*. 2004; 810: 269-275.
16. Lubes G., Goodarzi M. GC-MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds as biomarkers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 147: 313-322.
17. Malysheva A.O., Baldin M.N., Gruznov V.M., Blinova L.V. Vnelaboratornyj ekspresnyj gazohromatograficheskij metod analiza vydyhaemogo chelovekom vozduha s avtomatizirovannoj graduirovkoj. *Analitika i kontrol'*. 2018; 22(2): 177-185. (In Russ.)
18. Španěl R., Smith D. Volatile compounds in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2011; 14(5): 455-460.
19. Smith D., Španěl P., Herbig J., Beauchamp J. Mass spectrometry for real-time quantitative breath analysis. *J. Breath Res*. 2014; 8(2): 027101.
20. Gashimova E.M., Temerdashev A.Z., Porhanov V.A., Polyakov I.S., Perunov D.V., Azaryan A.A., Dmitrieva E.V. Ocenka vozmozhnosti gazohromatograficheskogo opredeleniya letuchih organicheskikh soedinenij v vydyhaemom vozduhe dlya neinvazivnoj diagnostiki raka legkih. *ZHurnal analiticheskoy himii*. 2019; 74(5): 365-372. (In Russ.)
21. Gashimova E.M., Temerdashev A.Z., Porhanov V.A., Polyakov I.S., Perunov D.V., Azaryan A.A., Dmitrieva E.V. Primenenie analiza vydyhaemogo vozduha dlya identifikacii markerov raka legkih. *Zlo-kachestvennyye opuholi*. 2019; 9(3S1): 66. (In Russ.)
22. Gorbunov I.S., Gubal' A.R., Ganeev A.A., Rodinkov O.V., Karcova L.A., Besonova E.A., Arsen'ev A.I., Nefedov A.O., Kraeva L.A. Optimizaciya uslovij analiza vydyhaemogo vozduha metodom gazovoj hromatografii–mass-spektrometrii dlya celej neinvazivnoj diagnostiki raka legkih. *ZHurnal analiticheskoy himii*. 2019; 74(11): 870-880. (In Russ.)
23. Xiao-An Fu, Mingxiao Li, Knipp R.J, Nantz M.H, Bousamra M. Noninvasive



- detection of lung cancer using exhaled breath. *Cancer Med.* 2014; 3(1): 174-181.
24. Fedrigo M., Hoeschen C., Oeh U. Multidimensional statistical analysis of PTR-MS breath samples: A test study on irradiation detection. *Int. J. Mass Spectrom.* 2010; 295: 13-20.
25. Righettoni M., Schmid A., Amann A., Pratsinis S.E. Correlations between blood glucose and breath components from portable gas sensors and PTR-TOF-MS. *J. Breath Res.* 2013; 7: 037110.
26. Laphorn C., Pullen F., Chowdhry B.Z. Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: Separating and assigning structures to ions. *Mass Spectrom. Rev.* 2013; 32: 43-71.
27. Malinovskaya L.K., CHomahidze P.SH., Bykova A.A., SHaltaeva YU.R., Belyakov V.V., Golovin A.V., Pershenkov V.S., Syrkin A.L., Betelin V.B., Kopylov F.YU. Protonnaya mass-spektrometriya vydyhaemogo vozduha v diagnostike hronicheskoy serdechnoj nedostatochnosti s sohrannoj frakciej vybrosa. *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya hirurgiya.* 2018; 11(6): 45-51. (In Russ.)
28. Szymanska, E., Tinnevelt G.H., Brodrick E., Williams M., Davies A.N., Van Manen H.-J., Buydens L.M.C. Increasing conclusiveness of clinical breath analysis by improved baseline correction of multi capillary column – ion mobility spectrometry (MCC-IMS) data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016; 127: 170175.
29. Michalcikova R.B., Dryahina K., Spanel P. SIFT-MS quantification of several breath biomarkers of inflammatory bowel disease, IBD; A detailed study of the ion chemistry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2016; 396: 35-41.
30. Smith D., Spanel P. Direct, rapid quantitative analyses of BVOCs using SIFT-MS and PTR-MS obviating sample collection. *TrAC.* 2011; 30: 945-959.
31. Španěl P., Smith D. Quantification of volatile metabolites in exhaled breath by selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. *Clin. Mass Spectrom.* 2020; 16: 18-24.
32. Rydosz A., Sensors for Enhanced Detection of Acetone as a Potential Tool for Noninvasive Diabetes Monitoring. *Sensors (Basel).* 2018; 18(7): 2298.
33. Arsen'ev A.I., Nefedova A.V., Ganeev A.A., Nefedov A.O., Novikov S.N., Barchuk A.A., Kanaev S.V., Dzhagacpanyan I.E., Gubal' A.R., Kononov A.S., Tarkov S.A., Aristidov N.YU. Kombinirovannaya rannaya diagnostika raka lyogkih opredeleniem sostava vydyhaemogo vozduha neselektivnym metodom analiza letuchih organicheskikh soedinenij s ispol'zovaniem metalloksidnyh sensorov s perekrestnoj chuvstvitel'nost'yu i citologicheskim issledovaniem mokroty. *Voprosy onkologii.* 2020; 66(4): 381-384. (In Russ.)
34. Ryabtsev S.V., Shaposhnick A.V., Lukin A.N., Domashevskaya E.P. Application of semiconductor gas sensors for medical diagnostics. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 1999; 59(1): 26-29. (In Russ.)
35. Shaposhnik A., Zviagin A., Sizask E., Vasiliev A. Acetone and Ethanol Selective Detection by a Single MOX-sensor. *Procedia Engineering.* 2014; 87: 1051-1054.
36. Zvyagin A.A., SHaposhnik A.V., Ryabcev S.V., SHaposhnik D.A., Vasil'ev A.A., Nazarenko I.N. Opredelenie parov acetona i etanola poluprovodnikovymi sensorami. *ZHurnal analiticheskoy himii.* 2010; 65(1): 96-100. (In Russ.)
37. Saasa V., Malwela Th., Beukes M., Mokgotho M., Liu Ch.-P., Mwakikunga B. Sensing Technologies for Detection of Acetone in Human Breath for Diabetes Diagnosis and Monitoring. *Diagnostics.* 2018; 8: 12. <https://doi.org/10.3390/diagnostics8020012>
38. Hashoul D., Haick H. Sensors for detecting pulmonary diseases from exhaled breath. *Eur Respir Rev.* 2019; 28: 190011.
39. Saidi T., Zaim O., Moufid M., Bari N.E., Ionescu R., Bouchikhi B. Exhaled breath analysis using electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry for non-invasive diagnosis of chronic kidney disease, diabetes mellitus and healthy subjects. *Sens. Actuators B.* 2018; 257: 178-188.



40. Van de Goor R., van Hooren M., Dingemans A.-M., Kremer B., Kross K. Training and Validating a Portable Electronic Nose for Lung Cancer Screening. *J. Thorac. Oncol.* 2018; 13: 676-681.
41. Kononov A., Gubal A., Gorbunov I., Chuchina V., Ganeev A., Korotetsky B., Ivanenko N., Stolyarova N., Jahatspanian I., Kozyrev K., Vasiliev A., Rassadina A., Arsenjev A., Barchuk A., Nefedov A., Iakovleva E., Sillanpää M., Safaei Z. Online breath analysis using metal oxide semiconductor sensors (electronic nose) for diagnosis of lung cancer. *Journal of Breath Research.* 2020; 14(1): 016004.
42. Nazarov V.E., Karaseva G.T., Uspenskij Yu.P., Dzhagacpanyan I.E. Ocenka riska patologicheskikh sostoyanij s pomoshch'yu analiza gazovogo sostava vydyaemogo vozduha. *Vestnik SPbGU.* 2013; 11(4): 218-225. (In Russ.)
43. Pavord D., Shaw D. E., Gibson P.G., Taylor D. R. Inflammometry to assess airway diseases. *The Lancet.* 2008; 372(9643): 1017-1019.
44. Dettmer K., Engewald W. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2002; 373(6): 490-500.
45. Kang S. How long may a breath sample be stored for at -80°C ? A study of the stability of volatile organic compounds trapped onto a mixed Tenax: Carbograph trap adsorbent bed from exhaled breath. *Journal of Breath Research.* 2016; 10(2): 026011.
46. Harshman S. Storage stability of exhaled breath on Tenax TA. *Journal of Breath Research.* 2016; 10(4): 046008. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/4/046008>
47. Harshman S.W., Pitsch R L., etc. Evaluation of a Standardized Collection Device for Exhaled Breath Sampling onto Thermal Desorption Tubes. *Journal of Breath Research.* 2020; 14(3): 036004.
48. Van der Schee M.P. Effect of transportation and storage using sorbent tubes of exhaled breath samples on diagnostic accuracy of electronic nose analysis. *Journal of Breath Research.* 2013. 7(1):016002. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/7/1/016002>
49. Grote C. Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Analytical Chemistry.* 1997; 69(4): 587-596.
50. Vas G., Vékey K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry.* 2004; 39(3): 233-254.
51. Mieth M. Multibed Needle Trap Devices For on Site Sampling and Preconcentration of Volatile Breath Biomarkers. *Analytical Chemistry.* 2009; 81(14): 5851-5857.
52. Di Gilio A., Palmisani J., Ventrella G., Facchini L., Catino A., Varesano N., Pizzutilo P., Galetta D., Borelli M., Barbieri P., Licen S., de Gennaro G. Breath Analysis: Comparison among Methodological Approaches for Breath Sampling. *Molecules.* 2020; 25(24): 5823.
53. Miekisch W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg G.F.E Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds. *Clinica Chimica Acta.* 2004; 347: 25-39.
54. O'Hara M.E., 'Hehir S.O., Green S., Mayhew C.A. Development of a protocol to measure volatile organic compounds in human breath: a comparison of rebreathing and on-line single exhalations using proton transfer reaction mass spectrometry. *Physiological Measurement.* 2008; 29(3): 309-330.
55. Amann A., Miekisch W., Pleil J.D., Risby T., Schubert J. Methodological Issues of Sample Collection and Analysis of Exhaled Breath. *Science Inventory.* 2010; 49: 96-114.
56. Bingi V.N., Stepanov E.V., Chuchalin A.G. Vysokochuvstvitel'nyj analiz NO, NH₃ i CH₄ v vydyaemom vozduhe s pomoshch'yu prestraivaemyh diodnyh lazerov. *Tr. In-ta obshchej fiziki im. A.M. Prohorova.* 2005; 61: 189-204. (In Russ.)
57. Anderson J. Modeling soluble gas exchange in the airways and alveoli. *Annals of Biomedical Engineering.* 2003; 31: 1402-1422.



58. Schubert J. CO₂ – controlled sampling of alveolar gas in mechanically ventilated patients. *Journal of Applied Physiology*. 2001; 90(2): 486-492.
59. Schubert J. In vivo evaluation of a new method for chemical analysis of volatile components in the respiratory gas of mechanically ventilated patients. *Technol Health Care*. 1999; 7(1): 29-37.
60. Sukul P. FEV manoeuvre induced changes in breath VOC compositions: an unconventional view on lung function tests. *Scientific Reports*. 2016; 6: 28029.
61. Dweik R. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011; 184(5): 602-615.
62. Sukul P. Immediate effects of breath holding maneuvers onto composition of exhaled breath. *Journal of Breath Research*. 2014; 8(3): 037102. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/3/037102>
63. Toyooka T., Hiyama Syu, Yamada Y. A prototype portable breath acetone analyzer for monitoring fat loss. *J. Breath Res*. 2013; 7(3): 036005.
64. Harshman S.W., Pitsch R.L., Davidson C.N. Evaluation of a Standardized Collection Device for Exhaled Breath Sampling onto Thermal Desorption Tubes. *Journal of Breath Research*. 2020; 14(3): 036004. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/ab7e3b>
65. Pribor dlya otbora prob vydyhaemogo vozduha Mistral [Elektronnyj resurs]: spravochnye dannye / URL: <https://www.mistral-breath.it/en/mistral/>
66. Pribor dlya otbora prob vydyhaemogo vozduha ReCIVA [Elektronnyj resurs]: spravochnye dannye / URL: <https://www.owlstonemedical.com/>.
67. Baldin M.N., Simakov V.A., Gruznov V.M., Moshkin M.P., Kozlov V.A., Firsov A.P. Probootbornik dlya gazovogo analiza vydyhaemogo vozduha. // Patent na poleznuyu model' RU 117078 U1, 20.06.2012. Zayavka № 2012106953/15 ot 27.02.2012.
68. Zolotov YU.A. Perspektivy razvitiya analiticheskoy himii. *ZHurnal analiticheskoy himii*. 2019; 74(9): 3-4. (In Russ.)
69. Cizin G.I., Zolotov YU.A. Kakie analiticheskie pribory proizvodyat v Rossii? *ZHurnal analiticheskoy himii*. 2021; 76(4): 369-379. (In Russ.)
70. YAshin YA.I., YAshin A.YA. Naukometricheskoe issledovanie sostoyaniya i tendencij razvitiya metodov hromatografii i apparatury. V kn.: 100 let hromatografii Otv. red. B.A.Rudenko. M., Nauka, 2003: 898-936. (In Russ.)
71. YAshin YA.I., YAshin A.YA. Sos- toyanie hromatograficheskogo priboro- stroeniya. *Zav.Lab*, 2003; 69(3): 19-31. (In Russ.)
72. Kolesnichenko I.N., Platonov I.A., Platonov V.I. Mikroanaliticheskie sistemy dlya opredeleniya endogennyh biomarkerov v vydyhaemom vozduhe. *Sovremennaya nauka: aktual'nye problemy i puti ih resh- eniya*. 2016;1(23): 41-46. (In Russ.)
73. Malysheva A.O., Baldin M.N., Gruz- nov V.M., Blinova L.V. Vnelaboratornyj ek- spressnyj gazohromatograficheskij metod analiza vydyhaemogo chelovekom vozduha s avtomatizirovannoj graduirovkoj. *Analitika i kontrol'*. 2018; 22(2): 177-185. (In Russ.)
74. Platonov I.A., Kolesnichenko I.N., Novikova E.A., Pavlova L.V. Ispol'zovanie sorbcionnyh mikrosistem dlya sozdaniya obrazcov sostava letuchih organicheskikh soedinenij. *Izmeritel'naya tekhnika*. 2019; 7: 62-66. (In Russ.)
75. Kulikov V.Yu., Ruyatkina L.A., So- rokin M.Yu., SHabanova E.S., Baldin M.N., Gruznov V.M., Efimenko A.P., Petrovskij D.V., SHnajder E.P., Moshkin M.P. Vzai- mosvyaz' mezhdu sodержaniem v vydy- haemom vozduhe acetona i osobennostyami metabolicheskikh narushenij u bol'nyh sa- harnym diabetom pervogo i vtorogo tipov. *Medicina i obrazovanie v Sibiri: elektronnyj nauchnyj zhurnal*. 2011; 1: 1-12. (In Russ.)



76. Rydosz A.A. Negative correlation between blood glucose and acetone measured in healthy and type-1 diabetes mellitus patient breath. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2015; 9: 881-884.

77. Amann A.; Smith D. Volatile Biomarkers. In *Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*. Elsevier BV. 2013. 568 p.

78. Rodinkov O.V., Zhuravlyova G.A., Vaskova E. A., Platonov I.A. Potassium Fluoride as a Selective Moisture Trapping Agent for SPE-TD-GC-FID Determination of Volatile Organic Compounds in the Air. *Analytical Methods*. 2015; 7(2): 458-465.

79. Kolesnichenko I.N., Anikina M.A., Platonov I.A. Optimisation of the conditions for the saturation and preparation of chromatodesorption microsystems for the production of acetone gas mixtures. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie Protsessy*, 2020; 20(4): 426-433. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/2949> (In Russ.)

80. Gorbacheva A.R., Rodinkov O.V. Hromatomembrannoe generirovanie standartnyh gazovyh smesey letuchih organicheskikh soedinenij na urovne ppm.

Analitika i kontrol'. 2018; 22(3): 267-272. (In Russ.)

81. Malysheva A.O., Baldin M.H., Gruznov B.M. Opredelenie koeffitsientov raspredeleniya letuchih organicheskikh veshchestv v sisteme zhidkost'-vozduh dlya sozdaniya graduirovocnyh gazoobraznyh obrazcov so sledovymi koncentraciyami veshchestv. *ZHurnal analiticheskoy himii*. 2017; 72(10): 867-871. (In Russ.)

82. Vitenberg A.G., Konopel'ko L.A. Parofaznyj gazohromatograficheskij analiz: metrologicheskie prilozheniya. *ZHurnal analiticheskoy himii*. 2011; 66(5): 452-472. (In Russ.)

83. Vitenberg A.G. Sticheskiy parofaznyj gazohromatograficheskij analiz. Fiziko-himicheskie osnovy i oblasti primeneniya. *Ros.him.zhurnal*. 2003; 57(1): 7-22. (In Russ.)

84. Margaryan A.E., Platonov I.A., Kolesnichenko I.N., Novikova E.A., Karsunkina A.S. Planar microfluid concentrators based on silagerm 8040 for sampling and sample preparation for the analysis of gas media. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie Protsessy*. 2023; 23(5): 732-740. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11691>. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

И.А. Платонов – д.т.н., профессор, заведующий кафедрой химии Самарского национально-исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

В.И. Платонов – к.х.н., доцент кафедры химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

И.Н. Колесниченко – к.х.н., доцент кафедры химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

О.В. Родинков – д.х.н., профессор, профессор кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

А.С. Брыксин – аспирант кафедры химии Самарского национально-исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

I.A. Platonov – prof., grand Ph.D (technical sciences), Head of the department of chemistry, Samara National Research University, Samara, Russian Federation, e-mail: pia@ssau.ru

V.I. Platonov – Ph.D. (chemistry), associate prof., department of Chemistry, Samara National Research University, Russian Federation, e-mail: rovvv@yandex.ru

I.N. Kolesnichenko – candidate of Chemical Sciences. Associate Professor of the chemistry Department, Samara National Research University, Samara, Russian Federation, e-mail: irniks@mail.ru

O.V. Rodinkov – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Professor of the Department of Analytical Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation, e-mail: o.rodinkov@spbu.ru

A.S. Bryksin – the postgraduate student of the Department of Chemistry, Samara National Research University, Samara, Russian Federation, E-mail: 79376442669@yandex.ru



А.Э. Маргарян – аспирант кафедры химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

Д.Л. Колесниченко – аспирант кафедры химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

A.E. Margaryan – the postgraduate student of the Department of Chemistry, Samara National Research University, Samara, Russian Federation, e-mail: asyaigithanyan@mail.ru

D.L. Kolesnichenko – graduate student of the Department of Chemistry, Samara National Research University named after Academician S.P. Queen, Samara, Russian Federation, e-mail: irniks@mail.ru

Статья поступила в редакцию 11.01.2024; одобрена после рецензирования 12.03.2024; принята к публикации 20.03.2024.

The article was submitted 11.01.2024; approved after reviewing 12.03.2024; accepted for publication 20.03.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12125

Хроматографические подходы в контроле качества пищевой продукции по химическому составу

Ярослав Олегович Рудаков^{1,3}, Владимир Федорович Селеменев¹,

Людмила Васильевна Рудакова², Олег Борисович Рудаков³

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Воронежский государственный медицинский университет, Воронеж, Россия

³Воронежский государственный технический университет, Воронеж, Россия, robi57@mail.ru

Аннотация. В статье представлен обзор хроматографических методов, комплексное использование которых обеспечивает контроль качества и безопасности пищевой продукции. Рассмотрены методы газовой хроматографии, позволяющие анализировать в продуктах летучие компоненты с использованием пламенно-ионизационного детектора, детектора электронного захвата, масс-селективных детекторов (ГХ-ПИД, ГХ-ДЭЗ, ГХ-МС, ГХ-МС/МС). Перечислены аналиты, которые можно определять с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с рефрактометрическим, спектрометрическими и масс-селективными детекторами (ВЭЖХ-РМД, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-СФД, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС). Показаны возможности ионной хроматографии и капиллярного электрофореза с электрохимическими детекторами (ИХ-ЭХД, КЭ-ЭХД) в определении ионогенных соединений. Отмечено значение тонкослойной хроматографии (ТСХ) в тандеме с оптическими цифровыми цветорегистрирующими устройствами в качественном и количественном анализе контаминантов в пищевой продукции. В связи с установлением негативного влияния микро- и нанопластика на здоровье человека актуальной задачей стало определение этих частиц в пищевой продукции, эту задачу можно решать с применением гелепроникающей хроматографии (ГПХ) и гидродинамической хроматографии (ГДХ), а также методом фракционирования в потоке в силовом поле (FFF).

Показано, что метод ГХ-МС в настоящее время становится приоритетным инструментальным методом, применяемым в аккредитованных аналитических лабораториях в идентификации примесей контаминантов в сельскохозяйственной продукции. Перспективен в этом аспекте метод пиролитической ГХ-МС. Пиролитическая ячейка не требует обязательного перевода твердого образца в раствор для его анализа.

Рассмотрены экстракционные и сорбционные методы подготовки проб для хроматографического анализа. Наиболее часто используют разнообразные способы жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), твердофазной экстракции (ТФЭ). В последнее время был разработан и широко внедрен комбинированный метод «квечерс» (QuEChERS). В обзоре авторы опирались в первую очередь на труды воронежских научных школ по хроматографии и смежным методам разделения.

Ключевые слова: газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, ионная хроматография, пищевая продукция, химический состав.

Для цитирования: Рудаков Я.О., Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. Хроматографические подходы в контроле качества пищевой продукции по химическому составу // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 197-208. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12125>

Original article

Chromatographic approaches to food quality control by chemical composition

Yaroslav O. Rudakov^{1,3}, Vladimir F. Selemenev¹,

Ludmila V. Rudakova², Oleg B. Rudakov³

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia



²Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

³Voronezh State Technical University, Voronezh, Russia, robi57@mail.ru[✉]

Abstract. The article provides an overview of chromatographic methods, which, when used comprehensively, ensure food quality control and safety. It considers gas chromatography methods that allow analysing volatile components in products using a flame ionization detector, an electron capture detector, and mass-selective detectors (GC-FID, GC-ECD, GC-MS, and GC-MS/MS). The article provides a list of analytes that can be detected by high performance liquid chromatography in combination with refractometric, spectrometric, and mass selective detectors (HPLC-RMD, HPLC-UV, HPLC-SPD, HPLC-MS, and HPLC-MS/MS). The study showed how ion chromatography and capillary electrophoresis with electrochemical detectors (IC-ECD, CE-ECD) can be used to detect ionogenic compounds. It highlighted the importance of thin layer chromatography (TLC) in combination with optical digital colour recording devices in the qualitative and quantitative analysis of contaminants in food products. Since it has been established that micro- and nanoplastics have a negative impact on human health, it is very important to detect these particles in food products. This task can be solved by using gel permeation chromatography (GPC) and hydrodynamic chromatography (HDC), as well as the method of field-flow fractionation (FFF).

It was shown that the GC-MS method is now becoming a priority instrumental method used in accredited analytical laboratories to identify impurities of contaminants in agricultural products. The pyrolytic GC-MS method is promising in this regard. The pyrolytic cell does not require the transfer of a solid sample into a solution for its analysis.

The paper considers extraction and sorption methods for the preparation of samples for chromatographic analysis. A variety of liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE.) methods are most commonly used. Recently, the QuEChERS method has been developed and widely implemented. The overview is primarily based on the papers dedicated to chromatography and related separation methods published by researchers belonging to Voronezh scientific schools.

Keywords: gas chromatography, high performance liquid chromatography, ion chromatography, food products, chemical composition.

For citation: Rudakov Ya.O., Selemenov V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B. Chromatographic approaches to food quality control by chemical composition. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 197-208. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12125>

Введение

Широкое применение комплекса хроматографических методов в аналитическом контроле качества и безопасности пищевой продукции зиждется на достижениях ученых и инженеров в теории, практике и техническом прогрессе в области хроматографии. В России успешно действует несколько научных школ, развивающих хроматографические методы: в Москве, Санкт-Петербурге, Самаре, Новосибирске, Нижнем Новгороде и Воронеже. Особо отметим воронежских ученых, которые обеспечили научное сопровождение аграрной промышленности Воронежской области и всего Центрального Черноземья [1-4].

Хроматографические методы основаны, как известно, на разделении смеси аналитов за счет процессов динамической сорбции и десорбции в гетерогенной

системе, состоящей из подвижной и неподвижной фаз. Разделенные компоненты анализируемой смеси поочередно попадают в детектор, регистрирующий аналитические сигналы в виде хроматограммы, на которой время удерживания характеризует хроматографические свойства, а геометрические размеры пиков – концентрацию аналитов.

Пищевая продукция, как правило, имеет сложный химический состав. Это многокомпонентные гетерогенные матрицы содержащие белки, углеводы, жиры, или их смеси в разных комбинациях, сравнительно низкомолекулярные органические вещества – витамины, БАВ и минеральные вещества природного, искусственного и синтетического происхождения. Кроме полезных компонентов пищевая продукция содержит разнообразные пищевые добавки, улучшающие реологические, органолептические и тех-



нологические характеристики продукции. Вместе с тем, в ней могут присутствовать контаминанты – загрязнители природного и антропогенного происхождения, ухудшающие качество и безопасность пищевой продукции.

В аналитической практике лабораторий Роспотребнадзора, в чью функциональную обязанность входит госконтроль над качеством и безопасностью пищевой продукции, универсального хроматографического метода не существует. Для определения химического состава продукции, обнаружения контаминантов, загрязняющих продукцию, применяют целый комплекс хроматографических методов. Газовая хроматография применяется для определения летучих органических соединений, подвижной фазой в этом случае служит газ-носитель. Жидкостная хроматография, в первую очередь, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), в которой подвижной фазой является жидкость, используется для разделения и анализа смесей термолабильных и относительно высокомолекулярных веществ. Ионогенные вещества, органические и неорганические электролиты – аналиты для ионообменной хроматографии (ИХ) и капиллярного электрофореза (КЭ, не является хроматографическим методом, его роднит с хроматографией наличие жидкой подвижной фазой). Для олигомеров, полимеров, биополимеров, наночастиц применяется эксклюзионная (гельпроникающая хроматография, ГПХ) и гидродинамическая жидкостная хроматография (ГДХ), а также фракционирование в потоке в силовом поле (FFF, в этом методе жидкость является подвижной фазой, но механизм удерживания отличен от хроматографии) (рис.1) [5-18].

Химический состав пищевой продукции

Химический брутто-состав пищевой продукции – количество жиров, углево-

дов, белков, витаминов и других биологически активных добавок (БАД) определяют с целью сертификации продукции, для установления ее пищевой ценности. Чтобы определить натуральность продукции, аутентичность, т.е. отсутствие фальсификации, требуется идентификация отдельных компонентов жиров, углеводов и аминокислот, выявление наличия или отсутствия тех или иных компонентов, или количественного соотношения аналитов. С этой точки зрения методы хроматографии, отличающиеся высокой эффективностью и селективностью разделения, являются приоритетными методами анализа в пищевой индустрии.

С точки зрения качества и безопасности продукции важнейшей задачей является определение наличия в ней экотоксикантов и контаминантов в количествах не превышающих предельно допустимую концентрацию (ПДК).

Если брутто-состав определяется методами физической сепарации, экстракции и классического химического анализа, то для решения задач идентификации и выявления конкретных химических соединений применяются те или иные хроматографические методы (табл. 1).

Газовая хроматография

В газовой хроматографии пищевой продукции в настоящее время применяют преимущественно капиллярные колонки (25-100 м) и пламенно-ионизационные детекторы (ПИД). Работа ПИД основана на изменении фонового тока водородного пламени при внесении в него органического вещества.

Другой ставший популярным детектором в пищевой химии стал масс-селективный детектор. Хромато-масс-спектрометрия – это гибридный метод анализа, сочетающий хроматографию и масс-спектрометрию. Сочетание газового хроматографа и масс-спектрометра (ГХ-МС) усиливает возможности обоих методов. Масс-спектрометр – высокочувствительный детектор, универ-

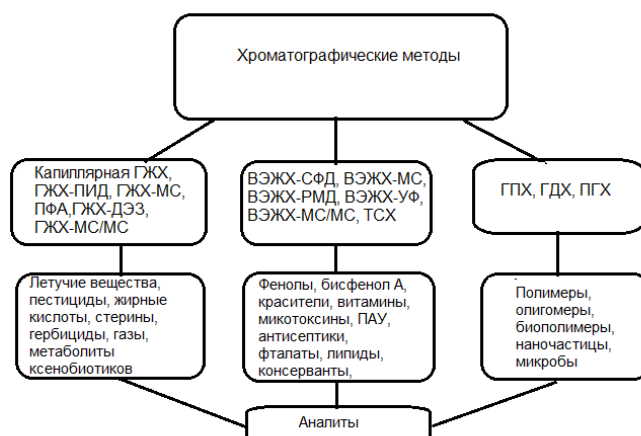


Рис. Хроматографические методы в определении химического состава пищевой продукции

Fig. Chromatographic methods used to determine the chemical composition of food products

сальный и селективный одновременно, с уникальной способностью по идентификации компонентов. Возможности МСД для качественного анализа в хроматографии превосходят возможности любых других детекторов. Детектор МСД позволяет идентифицировать соединения не только по временам удерживания, но и сравнивая масс-спектр пика определяемого вещества с библиотечным. Библиотеки насчитывают сотни тысяч различных соединений, а программное обеспечение проводит поиск в считанные секунды. Масс-спектрометр благодаря хроматографу сканирует разделенные индивидуальные соединения, таким образом аналитик работает с чистыми масс-спектрами. В аналитическую практику внедрены тандемные масс-спектрометры с квадрупольным масс-анализатором (МС/МС), они в сочетании с газовой хроматографией нашли широкое применение в аналитических решениях проблем биотехнологии, медицины, экологии и др. [17-21].

Разработаны и внедрены в газовую хроматографию десятки различных по принципу действия детекторов. Например, катарометр, или детектор по теплопроводности (ДТП). В основу работы ДТП положен процесс передачи

тепла от нагретого термочувствительного элемента к более холодному корпусу детектора за счет теплопроводности газового потока. С изменением состава газового потока меняется его теплопроводность. Детектор универсальный, но менее чувствительный, чем ПИД.

Следует упомянуть еще детектор электронного захвата (ДЭЗ), применяемый для контроля над рядом загрязнителей. Принцип действия этого детектора основан на захвате молекулами анализируемых соединений свободных электронов, находящихся в ионизационной камере детектора. В ДЭЗ устанавливается источник бета-излучения. Детектор селективен к галогенорганическим соединениям. Активно применяется для анализа хлорорганических пестицидов и летучей галогенорганики.

Жидкостная хроматография

В жидкостной хроматографии, в варианте ВЭЖХ, применяется своя линейка детекторов. Прежде всего универсальный рефрактометрический детектор (РМД), ультрафиолетовый (УФД), спектрофотометрический (СФД), включающий ультрафиолетовый, видимый и частично инфракрасный диапазон спектра, флуориметрический детектор (ФЛД), детектор по светорассеянию испаренного образца



Таблица 1. Хроматографические методы в определении химического состава пищевой продукции и ее загрязнителей [5-25]
Table 1. Chromatographic methods in determining the chemical composition of food products and their contaminants [5-25]

Метод разделения	Методы детектирования	Определяемые химические соединения
Капиллярная газожидкостная хроматография (ГЖХ)	Масс-спектрометр (МС), тандемный масс-спектрометр (МС/МС)	цис-, транс-изомерные жирные кислоты, пестициды, гербициды, метаболиты ксенобиотиков, стирол, бисфенол А, нонилфенол, глицидиловые эфиры, 3- и 2-хлорпропандиолы
ГЖХ, ПФА, ПФА-МС	Пламенно-ионизационный детектор (ПИД)	пестициды, гербициды, метанол, ПАВ, эфиры жирных кислот
ГЖХ	Детектор электронного захвата (ДЭЗ)	Галогенсодержащие пестициды, инсектициды, гербициды, бисфенол А
ВЭЖХ	МС, МС/МС	антибиотики, микотоксины, диоксины, ПАУ, инсектициды, сульфаниламиды, амфениколы, пенициллины, тетрациклины, витамины
ВЭЖХ	спектрофотометрические детекторы (УФД, СФД), рефрактометрические детекторы (РМД), электрохимические детекторы (ЭХД), детекторы по светорассеянию испаренного образца (ELSD)	Консерванты, тартразин, метаболиты ксенобиотиков, фенолы, эфиры фталатов, сульфаниламиды, фталаты, углеводы (монозы, биозы, триозы) и их производные, витамины, липиды, аминокислоты
ВЭЖХ	Флуориметрический детектор (ФЛД)	Макролиды, антибиотики, фикотоксины, афлатоксины
Ионная хроматография	ЭХД	Токсичные элементы, органические и неорганические ионы, нитраты, ПАВ, сульфиты, аминокислоты, пептиды, фосфолипиды
Эксклюзионная хроматография	Рефрактометрический детектор (РМД)	Олигосахариды, полисахариды, наночастицы, полипептиды, белки
Капиллярный электрофорез	ЭХД, СФД	Антибиотики, ионный состав, ПАВ, консерванты, бисфенол А, аминокислоты, водорастворимые витамины
Тонкослойная хроматография (ТСХ)	Видеоденситометры, сканеры, фотокамеры, смартфоны, УФ-камеры	экотоксиканты, антибиотики, микотоксины, фенолы, бисфенол А
Гидродинамическая хроматография	РМД, СФД	Биополимеры, наночастицы, микроорганизмы
Фракционирование в потоке в силовом поле (FFF)	РМД, СФД	Биополимеры, наночастицы, микроорганизмы, пыль

(ELSD). После решения технической проблемы сочетания жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии получил развитие методы ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС [13,17].

В ионной хроматографии нашли использование кроме оптических детекторов различные электрохимические детекторы (ЭХД) – кондуктометрические и амперометрические [9,13,17].

Таблица 2. Пути контаминации пищевой продукции [25]

Table 2. Ways of contamination in food products [25]

Источники загрязнений	Вид сырья	Пути контаминации	Контаминанты
Антропогенный	Растительное сырье, корма	Прямое осаждение на листьях, плодах и других открытых частях растений	Пестициды, инсектициды, фунгициды, гербициды, глифосат
Природный и антропогенный	Растительное сырье, корма	Всасывание через корневую систему из загрязнений почвы	Соли кадмия, свинца, цинка, ртути, минеральные удобрения, нитраты
Антропогенный	Сырое молоко, мясо	Аккумуляция в тканях животных, используемых для стимуляции их роста и лечения	Гормоны, антибиотики, ветеринарные препараты
Антропогенный	Сырое молоко, мясо	Образование в процессе технологической обработки, упаковки, транспортировки	ПАУ, нитрозоамины, фенолы, олово, свинец
Антропогенный	Полупродукты и продукты	Специальное внесение в продукт с целью улучшения его потребительских свойств и обеспечения ложноположительных интегральных показателей качества	Пищевые добавки, красители, консерванты, антиоксиданты, эмульгаторы, ароматизаторы, нейтрализаторы и др.
Природный	Молочные и мясные полупродукты и продукты	Бактериальная обсемененность и размножение бактерий с возможным образованием токсинов	<i>B. cereus</i> , токсины, <i>Cl. botulinum</i> , сальмонеллы, стафилококковые энтеротоксины и др.
Природный и антропогенный	Продукты переработки	Аккумуляция в продуктах при употреблении контаминированных кормов	Микотоксины: афлатоксины, охратоксины
Природный	Продукты переработки	Поражение паразитами	Паразиты и продукты их жизнедеятельности
Природный и антропогенный	Вода	Загрязнение источников питьевой воды, при транспортировке и в технологических процессах	Тяжелые металлы, органика, хлорорганика, ПАВ
Антропогенный	Вода	Миграция из тары	Микро- и нанопластик

Отдельно стоит сказать о методе тонкослойной хроматографии (ТСХ). Этот метод основан на применении пластин, на которые нанесен слой сорбента, качественным аналитическим сигналом в методе служит фактор замедления R_f – отношение расстояния, пройденного центром пятна, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя, а не время удерживания, а количественным – площадь пятна и интенсивность его окраски, после проведения хромофорной реакции, если аналит не имеет собственного цвета. В этом методе для качественного и количествен-

ного определения используются видеоденситометры, сканеры, цифровые фотокамеры, смартфоны, УФ-камеры, если определяемое вещество или фон пластины имеют поглощение в ультрафиолетовом диапазоне [10,13,35].

В табл. 1 приведены основные хроматографические методы разделения и способы детектирования химических соединений в пищевой продукции, в таблицах 2 и 3 приведены пути контаминации на разных технологических стадиях получения продуктов питания.

Таблица 3. Технологические стадии, на которых происходит загрязнение [25]

Table 3. Technological stages associated with pollution [25]

Стадия жизненного цикла продукции	Субъект воздействия	Контаминанты
Стадия получения сырого молока и мяса, муки	Объекты окружающей среды, корма	Пестициды, ветпрепараты и их метаболиты, природные токсины, токсичные и следовые элементы, аллергены
Стадия переработки молока и мяса, выпечка	Технологическое оборудование, обоснованные компоненты рецептуры и добавки	Токсичные элементы, фальсифицирующие добавки, наночастицы, моноклорпропандиолы, глицидиловые эфиры жирных кислот
Стадия упаковки готового продукта или полуфабриката	Упаковочные материалы, компоненты из тары	Тяжелые металлы, бисфенол А, мономеры, пластификаторы, наночастицы, микропластик
Стадия хранения	Микроорганизмы	Мигрирующие из упаковки контаминанты, микотоксины

Методы подготовки проб

Ахиллесовой пятой хроматографических методов является подготовка проб. Для введения в хроматографическую колонку и в случае ГХ, и ВЭЖХ, требуется смесь аналитов перевести, как правило, в раствор, который помещается в шприц, кран-дозатор, или автосемплер и уже с помощью этих дозирующих устройств небольшое количество пробы вводится в хроматографическую систему.

Пищевой продукт является гетерогенной системой неоднородной консистенции, перед хроматографическим анализом его измельчают, затем извлекают из образца искомые аналиты. Для этого применяют самые разнообразные физические и физико-химические методы сепарации: твердофазную экстракцию (ТФЭ), микро-ТФЭ; низкотемпературную ТФЭ, жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ), высаливание, высахаривание, микро-ЖЖЭ, дисперсионную микро-ЖЖЭ, флюидную экстракцию, низкотемпературную микро-ЖЖЭ (liquid-liquid extraction with partition at low temperature, LLE-PLT), экстракционное вымораживание; газовую экстракцию (head space), экстракцию ионными жидкостями, комбинацию способов разделения, получившую название квечерс (QuEChERS), (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe –

быстрый, простой, дешевый, эффективный и безопасный) [24-27].

ЖЖЭ в разных модификациях основана на переводе веществ из одной жидкой фазы в другую при их непосредственном контакте; при этом жидкие фазы не должны смешиваться, то есть их взаимная растворимость должна быть очень мала. Если одна фаза – полярная жидкость (вода), а вторая – неполярный растворитель, гидрофобные компоненты вытесняются во второй растворитель, а гидрофильный – в воду. Этому способствуют высаливание, высахаривание, вымораживание и даже просто понижение температуры. В этих случаях возможно применение растворителей, которые расслаиваются с водой при высаливании, добавлении водорастворимого полимера или при низких температурах (LLE-PLT). ЖЖЭ применяют как с целью получения первоначального экстракта твердых, жидких или диспергированных образцов, так в целях очистки экстракта и замены растворителя экстракта.

В газовой хроматографии летучих соединений применяют метод парофазного анализа (ПФА, head space) [28]. Для извлечения летучих целевых соединений используют парофазную экстракцию. Сущность этого подхода состоит в выделении из образца паров содержащихся в

нем летучих соединений при помощи нагревания, пропускания потока инертного газа или при применении комбинации обоих воздействий. Агрегатное состояние образца может быть как жидким, так и твердым.

Метод твердофазной экстракции (ТФЭ), основанный на извлечении целевых соединений из жидких образцов, экстрактов и газообразных образцов путем их адсорбции на малых количествах (от нескольких до сотен мг) адсорбционных материалов стал одним из основных в аналитической практике [24]. Элюирование (смыв) целевых аналитов осуществляют сравнительно небольшими объемами в пределах десяти мл, что дает возможность избежать при проведении пробоподготовки операций, связанных с применением и расходом больших объемов растворителей. Метод адсорбционной очистки (АО), основанный на извлечении из жидких образцов и экстрактов мешающих анализу компонентов матрицы путем адсорбции на малых количествах (от нескольких до сотен мг) адсорбционных материалов. При проведении АО целевые соединения (аналиты) проскакивают через сорбционный материал, то есть не сорбируются, а остаются в пробе (экстракте). Закономерности и технические средства проведения ТФЭ и АО одинаковы; различие подходов заключается в логике их применения. В методе ТФЭ целевые соединения на первой стадии удаляются из образца (экстракта) адсорбцией на подходящем материале, что позволяет проводить как очистку пробы, так и ее концентрирование, а также проводить замену растворителя пробы. В методе АО целевые соединения проскакивают через сорбент, который лишь поглощает часть загрязняющих пробу соединений; таким образом, АО применима исключительно для проведения очистки пробы. Нередко АО осуществляют на достаточно дешевых сорбентах, которые применяют однократно и выбрасывают после использования. При проведении

ТФЭ, напротив, стараются регенерировать адсорбционные материалы и использовать их многократно, что дает возможность применять для твердофазной экстракции более дорогие и качественные (нередко также специализированные) адсорбенты. В совокупности ТФЭ и АО называют сорбционными методами подготовки пробы. Сорбция может осуществляться в статических и динамических условиях [24].

Широкое применение в анализе пищевых продуктов получил комбинированный метод пробоподготовки квечерс (QuEChERS) [24-27]. Метод QuEChERS используют для обнаружения остатков пестицидов, антибиотиков, полиароматических углеводородов (ПАУ), полихлорированных дифенилов и других контаминантов в пищевых продуктах. Образец (фрукты, овощи, яйца и т.д.) гомогенизируют, центрифугируют с реагентом и перемешивают в течение 1 мин. Используемые реагенты зависят от типа анализируемого образца. Затем проводится экстракция. Этот шаг основан на распределении вещества между фазами посредством высаливания или холодной ЖЖЭ. При этом устанавливается равновесие между водной и органической фазами. На втором этапе осуществляется очистка способом дисперсионной твердофазной экстракции (ТФЭ) с последующим использованием различных сочетаний солей и пористых сорбентов, чтобы удалить мешающие вещества. Детектирование соединений обычно проводится методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) или жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС).

После получения в результате операций отделения аналитов от матрицы продукта в виде раствора с достаточной концентрацией может потребоваться дополнительная стадия подготовки – дериватизация. Для целей ГХ аналиты переводят в сравнительно летучее производное. Например, жиры подвергают гидролизу,



образовавшиеся жирные кислоты метилируют [12]. Смесь метиловых эфиров жирных кислот анализируют методом ГЖХ. Смесь моно- и дисахаридов силилируют, и методом ГЖХ уже анализируют силлилпроизводные. В случае ВЭЖХ также используют получение производных, например, для того, чтобы их можно было бы детектировать оптическими или масс-спектрометрическими детекторами [29].

Пиролитическая хроматография

Определенные возможности при идентификации пищевой продукции имеет метод пиролитической газовой хроматографии (ПГХ) [12,30]. ПГХ нашла свое применение в анализе полимеров. В пиролитическом процессе происходит термический распад полимера на различные сравнительно низкомолекулярные соединения. Продукты пиролитического распада для полимеров, отличающихся первичной структурой, фракционным составом, строением мономерных звеньев, регистрируются на хроматограммах в виде набора пиков, специфичного для того или иного полимера, давая своеобразные «отпечатки пальцев». Этот метод применим и для идентификации биополимеров, белков и олиго- и полисахаридов, липидов. Современное сочетание ПГХ с масс-спектрометром (ПГХ-МС) открывает дополнительные возможности метода, так как по масс-спектрам разделенных продуктов пиролитического распада можно расшифровать химическую структуру полимера и технологию производства (обратный инжиниринг), выявить механизм и кинетику деградации анализируемого объекта, провести качественный и количественный анализ добавок (антиоксиданты, стабилизаторы, пластификаторы, антистатик, антипопутнители, огнеупоры, порообразователи и др.) [31]. Таким образом, метод ПГХ-МС пригоден для контроля качества и безопасности полимерной тары и упаковочных материалов, применяемых в пищевой промышленности. Упаковка является одним из источников

контаминации пищи [32-34,36]. Но этот метод применим и для анализа сложных природных матриц, из которых состоит пища, в этих матрицах содержится большое количество различных пищевых добавок и биополимеров. Большим преимуществом ПГХ-МС является то, что пиролитическая ячейка не требует перевода твердого образца в раствор, то есть минимизируется алгоритм подготовки проб. При программируемом нагреве ячейки в начале хроматографируются летучие компоненты и только затем продукты пиролитического распада. Актуальной задачей является внедрение ПГХ-МС в аналитическую практику в области контроля качества и безопасности пищевых продуктов.

Заключение

Широкое применение комплекса хроматографических методов в пищевой промышленности обеспечивает полноценный контроль химического состава конечных продуктов и биотехнологических процессов на разных стадиях их производства и хранения. Особенно важная роль хроматографических методов принадлежит контролю минорных аналитов: биологически активных веществ, витаминов, пищевых добавок, экотоксикантов и контаминантов, в выявлении аутентичности продукции. Для этих целей в аналитических лабораториях необходим набор хроматографических приборов ГЖХ, ИХ, ВЭЖХ, способных обеспечить этот контроль. Наиболее эффективно сочетание хроматографических методов разделения с масс-спектрометрическим детектированием. Перспективным методом для анализа пищевых продуктов является пиролитическая газовая хроматография с МСД, однако не следует отказываться от детекторов, зарекомендовавших себя в рутинных анализах: ПИД, ДЭЗ – в газовой хроматографии, МСД, СФД – в ВЭЖХ, ЭХД - в ионной хроматографии и электрофорезе.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые

Список литературы/References

1. Selemenev V.F., Rudakov O.B. Voronezhskie nauchny`e shkoly` po khromatograficheskim i drugim rodstvenny`m metodam. *Analitika*. 2023; 13(3): 226-230. <https://doi.org/10.22184/2227-572X.2023.13.3.226.230> (In Russ.)
2. Rudakov O.B., Ry`bakova E.V. Khromatografiya i my`. K 150-letiyu so dnya rozhdeniya M.S. Czvetva. *Khimiya, fizika i mexanika materialov*. 2022; 2(33): 108-123. (In Russ.)
3. Nasledie M.S. Czvetva v trudax voronezhskix ximikov: V 2 tomax / V.F. Selemenev, O.B. Rudakov, D.L. Kotova et al. V. 1. Voronezh: Izdatel`sko-poligraficheskij centr "Nauchnaya kniga", 2021. 358 p. (In Russ.)
4. Nasledie M.S. Czvetva v trudax voronezhskix ximikov: V 2 tomax / V.F. Selemenev, O. B. Rudakov, D. L. Kotova et al. V. 2. Voronezh: Izdatel`sko-poligraficheskij centr "Nauchnaya kniga", 2021. 330 p. (In Russ.)
5. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B. Lipidomika. Voronezh: Nauchnaya kniga, 2023, 316 p. (In Russ.)
6. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B. Vitaminy` kak ob`ekty` pishhevoj ximii i farmakologii. Voronezh: Izdatel`sko-poligraficheskij centr "Nauchnaya kniga", 2022, 212 p. (In Russ.)
7. Rudakov O.B., Korol`kova N.V., Polyanskij K.K. Texnoximicheskij kontrol` v texnologii zhirov i zhirozamenitelej. Sankt-Peterburg: Izdatel`stvo "Lan`", 2020, 576 p. (In Russ.)
8. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B. Fosfolipidy` na fone prirodny`x matricz. Voronezh: Izdatel`sko-poligraficheskij centr «Nauchnaya kniga», 2020, 318 p. (In Russ.)
9. Dolgonosov A. M., Rudakov O. B., Prudkovskij A. G. Kolonochnaya analiticheskaya xromatografiya: praktika, teoriya,

могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

modelirovanie. Sankt-Peterburg, Izdatel`stvo "Lan`", 2015, 468 p. (In Russ.)

10. Rudakova L.V., Rudakov O.B. Informacionny`e texnologii v analiticheskom kontrole biologicheskii aktivny`x veshhestv. Sankt-Peterburg: Izdatel`stvo "Lan`", 2015, 468 p. (In Russ.)

11. Polyanskij K.K., Rudakov O.B., Podporinova G.K. Natural`ny`e i iskusstvenny`e podslastiteli. Svoystva i e`kspertiza kac hestva. Moskva: OOO "DeLi print", 2009, 252 p. (In Russ.)

12. Rudakov O.B., Ponomarev A.N., Polyanskij K.K., Lyubar` A.V. Zhiry`. Ximicheskij sostav i e`kspertiza kachestva. M.: OOO "DeLi print", 2005, 312 p. (In Russ.)

13. Rudakov O.B., Selemenev V.F., Vostrov I.A. Sputnik xromatografista. Metody` zhidkostnoj xromatografii. Voronezh, 2004, 526 p. (In Russ.)

14. Rudakov O.B., Rudakova L.V. Aminokislotny`j analiz belkov myasa. *Myasny`e texnologii*. 2020; 2(206): 29-35. (In Russ.)

15. Rudakov O.B., Rudakova L.V., Polyanskij K.K. Analiticheskij kontrol` kontaminantov v pishhevoj produkcii – garantiya ee kachestva i bezopasnosti. Innovacionnoe predprinimatel`stvo: social`noe i ekonomicheskije i marketingovy`e aspekty`: materialy` Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskij konferencii, Voronezh, 28-29 aprelya 2017 goda Voronezh: Izdatel`sko-poligraficheskij centr "Nauchnaya kniga", 2017: 362-368. (In Russ.)

16. Yashin A., Yashin Ya., Chernousova N. Opredelenie summarnogo soderzhaniya zhirorastvorimy`x antioksidantov v molochny`x, ry`bny`x, myasny`x produktax i rastitel`ny`x maslax. *Analitika*. 2012; 5(6):16-21. (In Russ.)

17. Yashin Ya.I. Yashin A.Ya. Analiticheskaya xromatografiya. Metody`, apparatura, primenenie. *Uspexi ximii*. 2006; 75(4): 366-379. (In Russ.)



18. Lavruxina O.I., Amelin V.G., Kish L.K. Opredelenie ostatochny`x kolichestv pesticidov v ob`ektax okruzhayushhej sredy` i pishhevy`x produktax. Obzor. *Ximicheskaya bezopasnost`*. 2022; 6(2): 81-116. (In Russ.)
19. Amelin V.G., Nikeshina T.B., Tret'yakov A.V. Identifikaciya i opredelenie pesticidov i policiklicheskih aromatischeskih uglevodorodov v vode i pishhevy`x produktax metodom xromato-mass-spektrometrii. *Zhurnal analiticheskoy ximii*. 2011; 66(10): 1036-1041. (In Russ.)
20. Bol'shakov D.S., Kochetova A.N., Podkolzin I.V. Sovremennyy`e metody` opredeleniya podlinnosti pishhevy`x produktov. *Trudy` Federal'nogo centra ohrany` zdorov'ya zhivotny`x*. 2020; 17: 257-299. (In Russ.)
21. Borisova T. Kontrol` kachestva produktov pitaniya i pishhevogo sy`r'ya. Resheniya Shimadzu. *Analitika*. 2016; 3(28): 64-71. (In Russ.)
22. Vinogradova N. I. Tonkoslojnaya xromatografiya. M-vo vnutrennix del Rossijskoj Federacii, Moskovskij un-t. Moskva: MosU MVD Rossii, 2008, 23 p. (In Russ.)
23. Paczovskij A.P. Sovremennyy`e dostizheniya v oblasti tonkoslojnoj xromatografii. *Mir izmerenij*. 2013; 1: 36-40. (In Russ.)
24. Sy`chev K.S. Podgotovka proby` dlya gazovoj i zhidkostnoj xromatografii. Moskva. Iz-vo Integrated BioSeparation Solutions OU, 2019. 128 p. (In Russ.)
25. Rudakov O.B., Rudakova L.V., Pol'yanskij K.K. Mesto xromatografii v kontrole kachestva i bezopasnosti sy`r'ya i sel'skoxozyajstvennoj produkcii. Proizvodstvo i pererabotka sel'skoxozyajstvennoj produkcii: menedzhment kachestva i bezopasnosti: Materialy` mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, posvyashhennoj 25-letiyu fakul'teta tekhnologii i tovarovedeniya Voronezhskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta imeni imperatora Petra I, Voronezh, 07-09 noyabrya 2018 goda. Tom Chast` II. Voronezh: Voronezhskij gosudarstvenny`j agrarny`j universitet im. Imperatora Petra I, 2018; 405-410. (In Russ.)
26. Rudakov O.B., Selemenev V.F., Rudakova L.V. Nizkotemperaturnoe razdelenie i koncentrirovaniye v usloviyax obrazovaniya geterogenny`x sistem (obzor), *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2019; 19(4): 418-433. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2019.19/780>. (In Russ.)
27. Rudakov O.B., Selemenev V.F., Rudakova L.V., Podolina E.A. Xromatograficheskie i e`kstrakcionny`e svojstva acetonitrila i ego smesej s vodoj. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy`*. 2018; 18(4): 458-478. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/554> (In Russ.)
28. Stolyarov B. V. Gazoxromatograficheskij parofazny`j analiz reakcionny`x sistem: dissertaciya... doktora ximicheskix nauk. Sankt-Peterburg, 2000. 397 p. (In Russ.)
29. Rudakov O.B., Rodionova N.S., Bocharova O.N. Sovremennoe sostoyanie kolichestvennogo kontrolya uglevodov v pishhevy`x produktax metodami vy`sokoe`ffektivnoj zhidkostnoj xromatografii (obzor). *Xranenie i pererabotka sel'xozsy`r'ya*, 1999; 2: 52-56. (In Russ.)
30. Rudakov O.B., Boev A.I., Nikitina S.Yu. Vozmozhnosti piroliticheskoy xromatografii v identifikacii molochnogo zhira. *Xranenie i pererabotka sel'xozsy`r'ya*. 2002; 3: 49-52. (In Russ.)
31. Rudakov O.B., Xoroxordin A.M., Rudakov Ya.O., Xoroxordina E.A. Prime-nenie piroliticheskoy xromato-mass-spektrometrii v kontrole kachestva stroitel'ny`x polimerov i kompozitov. *Stroitel'ny`e materialy`*. 2022; 8: 65-69. <https://doi.org/10.31659/0585-430X-2022-805-8-65-69> (In Russ.)
32. Rudakov O.B., Rudakova L.V. Bisfenol A: s chem ego edyat? *Pererabotka moloka*. 2019; 6(236): 24-26. <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2019-6-24-26> (In Russ.)



33. Rudakov O.B., Rudakova L.V. PE`T-upakovka na vzglyad khimika-analitika. *Pererabotka moloka*. 2019; 8(238): 36-41. <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2019-8-36-40> (In Russ.)

34. Rudakov O.B., Rudakova L.V. NANOchasticy iz plastika – aktual`ny`j kontaminant pishhevoj produkcii. *Myasny`e texnologii*. 2019; 10(202): 48-51. <https://doi.org/10.33465/2308-2941-2019-10-48-51> (In Russ.)

35. Rudakov O.B., Rudakova L.V., Abbud M. Cifrovaya czvetometriya v farmaceuticheskom analize i kontrole produktov pitaniya. *Analitika*. 2014; 14(1): 58-67. (In Russ.)

36. Rudakov O.B., Rudakova L.V. Obesogeny` – ser`eznaya problema pishhevoj industrii. *Myasny`e texnologii*, 2024; 2: 38-41. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Я.О. Рудаков – инженер кафедры химии и химической технологии материалов Воронежского государственного технического университета, аспирант кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж

В.Ф. Селеменев – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, Россия

Л.В. Рудакова – д.х.н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного медицинского университета, Воронеж, Россия

О.Б. Рудаков – д.х.н., зав. кафедрой химии и химической технологии материалов Воронежского государственного технического университета, Воронеж, Россия

Ya.O. Rudakov – engineer of Department of chemistry and chemical technology of materials of Voronezh state technical University, postgraduate student of the Department of Analytical Chemistry of Voronezh State University Voronezh, Russia

V.F. Selemenev – Dr. Sci (Chemistry), professor of the Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia

L.V. Rudakova – Dr. Sci (Chemistry), head of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology of Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

O.B. Rudakov – Dr. Sci (Chemistry), head of Department of chemistry and chemical technology of materials of Voronezh state technical University, Voronezh, Russia, e-mail: robi57@mail.ru

Статья поступила в редакцию 04.03.2024; одобрена после рецензирования 16.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 04.03.2024; approved after reviewing 16.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 539.19:539.2

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12126

Теоретический расчет параметров метода трехпараметрической характеристики хроматографических фаз

I. Параметр дисперсионных сил – обобщенный заряд

Елена Александровна Зайцева[✉], Анатолий Михайлович Долгонос

Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, Москва, zaitceva@geokhi.ru[✉]

Аннотация. Селективность разделения в газовой хроматографии определяется природой неподвижной фазы. В рамках предложенной авторами ранее модели межмолекулярных взаимодействий и разработанного на ее основе теоретического метода трехпараметрической характеристики хроматографических неподвижных жидких фаз делается количественная оценка способности молекул к участию в дисперсионных, диполь-дипольных взаимодействиях и в водородных связях. Метод показал свою эффективность при описании свойств неподвижных фаз на основе углеводов, полиэтиленгликоля, полисилоксанов и ионных жидкостей. Свойства неподвижных фаз и молекул анализов описываются двумя характеристиками селективности: полярностью и гидрофильностью, которые могут быть рассчитаны по прямой задаче по структурной формуле вещества и по обратной задаче по экспериментальным данным в виде индексов удерживания Ковача или констант Роршнайдера-МакРейнольдса; противоречия между результатами расчета характеристик двумя способами обнаружено не было. С помощью предложенного метода была выявлена связь между молекулярной массой полимерной молекулы и величинами характеристик селективности. Предложена карта селективности как удобный наглядный способ классификации неподвижных фаз, которая может быть применена в сочетании с принципом подобия свойств для выбора наиболее селективной к заданным анализам неподвижной фазы; этот выбор может быть сделан без проведения экспериментов. Предлагаемая работа посвящена определению обобщенного заряда как первого и ключевого параметра метода трехпараметрической характеристики. Основным инструментом послужила разработанная ранее в лаборатории сорбционных методов ГЕОХИ РАН теория обобщенных зарядов. Эта теория, выведенная из фундаментальных принципов, описывает ван-дер-ваальсовы взаимодействия в виде потенциала Леннард-Джонса с помощью характеристик молекул, определяемых из молекулярной структуры. Ранее с ее помощью были успешно описаны неполярные хроматографические системы. В работе даны определения обобщенных зарядов, показана их связь с физическими и экспериментальными величинами, приведены расчетные формулы для изолированных молекул и для жидких фаз. Представлены результаты детального расчета обобщенных зарядов веществ разных классов, включающих в себя газохроматографические неподвижные фазы.

Ключевые слова: энергия адсорбции, межмолекулярные взаимодействия, газовая хроматография, неподвижная фаза, обобщенный заряд, молекулярные дескрипторы.

Благодарности: работа выполнена за счет средств бюджетного финансирования Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук.

Для цитирования: Зайцева Е.А., Долгонос А.М. Теоретический расчет параметров метода трехпараметрической характеристики хроматографических фаз. I. Параметр дисперсионных сил – обобщенный заряд // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 209-226. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12126>

Original article

Theoretical calculation of the parameters of the three-parameter chromatographic phase characterization method

I. Dispersion forces parameter – generalized charge

Elena A. Zaitceva[✉], Anatoliy M. Dolgonosov

Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, zaitceva@geokhi.ru[✉]



Abstract. In this work we studied the flavonoid composition of tangerine skins using 10 kinds of tangerines from the selectivity of separation in gas chromatography is determined by the nature of the stationary phase. The authors previously proposed a model of intermolecular interactions and a theoretical method of three-parameter characterisation of stationary phases in liquid chromatography based on it. They were applied to quantify the ability of molecules to participate in dispersion and dipole-dipole interactions and hydrogen bonds. The method proved to be efficient to describe the properties of stationary phases based on hydrocarbons, polyethylene glycol, polysiloxanes, and ionic liquids. The properties of stationary phases and analyte molecules are described by two selectivity characteristics: polarity and hydrophilicity, which can be calculated as a direct problem using the structural formula of the substance, or as an inverse problem using experimental data in the form of the Kovacs retention indices or Rohrschneider and McReynolds constants. No contradictions have been found between the characteristics calculated by the two methods. Using the proposed method, the relationship between the molecular weight of the polymer molecule and the values of selectivity characteristics was revealed. We proposed a selectivity map as a convenient and illustrative way to classify the stationary phases. Backed by the principle of similarity of properties, it can be used to determine the most selective stationary phase for a given analyte, without any experiments.

The aim of this work was to determine the generalised charge as the first and key parameter of the three-parameter characterisation method. The main tool was the theory of generalised charges developed earlier in the laboratory of sorption methods of GEOKHI RAS. This theory, derived from fundamental principles, describes van der Waals interactions in the form of a Lennard-Jones potential, using the characteristics of molecules determined from their molecular structure. Previously, it successfully described nonpolar chromatographic systems. In the present study, we defined generalised charges, showed their relation to physical and experimental values, and provided calculation formulas for isolated molecules and for liquid phases. We presented the results of a detailed calculation of the generalised charges of substances of different classes, including gas chromatographic stationary phases.

Keywords: adsorption energy, intermolecular interactions, gas chromatography, stationary phase, generalised charge, molecular descriptors.

Acknowledgments: the study was carried out at the expense of budgetary funds of the Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Zaitceva E.A., Dolgonosov A.M. Theoretical calculation of the parameters of the three-parameter chromatographic phase characterization method. I. Dispersion forces parameter – generalized charge. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 209-226. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12126>

Введение

Основной областью интересов авторов является развитие теоретической модели межмолекулярных взаимодействий и создание на ее основе метода классификации и характеристики селективности хроматографических жидких неподвижных фаз [1-10]. Межмолекулярные взаимодействия в хроматографической системе описываются выражением для полной энергии адсорбции [1-2]: $U = U_{np} + U_{dp} + U_H$, где U_{np} – неполярная энергия, представленная как потенциал Леннарда-Джонса в теоретическом виде [11-12], U_{dp} – полярная энергия, представленная как сумма энергий ориентационного [13-14] и индукционного взаимодействий [15-16], U_H – энергия водородной связи (H-связи) [6,8-10,17]. По числу независимых характеристик молекул метод назван методом трехпараметрической характеристики (ТПХ). С помощью метода ТПХ

можно достаточно точно рассчитать характеристики неподвижных фаз двумя способами – по хроматографическим экспериментальным данным и по структурной формуле исследуемых неподвижных фаз или молекул аналитов [8-10].

Основанная на грубом принципе аддитивности атом-атомных потенциалов (ААП) полуэмпирическая молекулярно-статистическая теория адсорбции используется для расчета энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий более 40 лет [18-22]. Эта теория применена в расчетах систем «графитированная термическая сажа (ГТС) – органические соединения разных классов», в результате чего накоплена целая база данных. Возможности упомянутого метода весьма ограничены, что влияет, например, порядок выхода изомеров в смесях из колонки – предсказанный теоретически порядок не подтверждается экспериментом. Причиной этого является правило аддитивности ААП.



Использование принципа ААП при расчете энергии межмолекулярных взаимодействий (ММВ) удобно и универсально, а неточность его невелика – порядка 10%. Однако стоит уточнить, что при таком расчете неточность для энергии в единицы процентов даст большую погрешность. Принцип ААП пренебрегает величиной энергии, отвечающей за жесткость связей в молекуле. Эта энергия имеет порядок энергии адсорбции, что приводит к существенным ошибкам. Методы молекулярно-статистической теории в априорных расчетах неприменимы из-за отсутствия физического смысла в параметрах этой теории.

Известна модель сольватационных параметров Абрахама [23-25], используемая для описания свойств хроматографических фаз. Сольватационные параметры определяются как корень квадратный из равновесной энергии взаимодействия одинаковых молекул и участвуют в описании взаимодействия более сложных молекул в виде аддитивных инкрементов. Модель широко применяется для описания свойств хроматографических неподвижных фаз и включает в себя два типа сольватационных параметров – молекулярные дескрипторы изолированных молекул и параметры неподвижной фазы, определяемые по результатам хроматографических экспериментов методом линейной регрессии [26]. Сольватационные параметры имеют физико-химический смысл, который дает возможность проводить сравнение и анализ природы взаимодействий в разных системах. Модель Абрахама совпадает с методом ААП в части недостатков, связанных с правилом сложения инкрементов и эмпирическим способом их определения.

Очевидна необходимость применения теоретических знаний о сорбции близких по свойствам веществ в хроматографии. Это требует применения подходов, позволяющих проводить расчеты *a priori*, на что не способны существующие кван-

тово-механические методы, непереносимые на другие системы и имеющие большое число экспериментальных параметров, приводящих к грубым ошибкам при вычислении энергии ММВ [27-28].

С целью избавления от упомянутых недостатков известных подходов была предложена новая нелинейная теория адсорбции, в которой принцип аддитивности ААП не используется [11-12, 29-35]. Для объяснения этой теории была разработана теория обобщенных зарядов (ОЗ) [11-12, 36-39]. Вводится понятие «обобщенный заряд», проистекающее из двух обстоятельств: 1) формальное понятие заряда, величины, пропорциональной энергии межатомного взаимодействия; 2) обобщенный заряд объединяет участие в межатомном поле одновременно нескольких электронов, обобщенных в этом смысле в рамках молекулы или фрагмента молекулы. Обобщенные заряды участвуют в выражениях для потенциальной энергии адсорбции, определяют дифференциальную теплоемкость адсорбции и молекулярную площадку. Следствия теории стали основой для нового подхода в адсорбции [40-42].

Целью настоящего сообщения является теоретический расчет обобщенного заряда органических и кремнийорганических веществ, в том числе используемых в качестве газохроматографических неподвижных фаз, по их структурной формуле.

Теоретическая часть

Понятие обобщенного заряда. В [43] дан фундаментальный вывод соотношений поля обобщенных зарядов и формальное определение понятия обобщенного заряда характеристики атомов и молекул. Обобщенные заряды (ОЗ) пропорциональны энергии межмолекулярного взаимодействия:

$$U_{jj'}(r) = Q_j Q_{j'} u_b(r) \quad (1)$$

где $Q_j, Q_{j'}$ – ОЗ атомов или молекул j и j' , $u_b(r)$ – функция расстояния, которая для межмолекулярных взаимодействий

имеет вид потенциала Леннард-Джонса с теоретическими коэффициентами.

Здесь мы рассматриваем феноменологическое определение, отражающее характер ОЗ. Аддитивной характеристикой, свойственной элементам жестких механических систем является объем. Понятие объема существует также для жестких молекул и их фрагментов – как функции площади молекулярной площадки W [29, 44]. Пропорциональность ОЗ и площади адсорбента, приходящейся на данный изолированный атом или молекулу, дает связь между характеристиками жесткой молекулы и ее атомов [30, 31, 43]:

$$Q = \left(\sum_{j=1}^N Q_j^b \right)^{1/b} \quad (2)$$

где Q – ОЗ (в единицах элементарного заряда e) атома j в молекуле, состоящей из N атомов; показатель для ван-дер-ваальсового поля равен: $b = 4/3$.

Если «объем» атома или молекулы определить как $V = Q^{4/3}$, или, выражая обратной процедурой ОЗ:

$$Q = V^{3/4}, \quad (3)$$

то согласно (2) получим, что величина V является суммой «объемов» валентных электронов (т.е. «электронных объемов») атома или молекулы. Электронный объем σ -электрона равен 1, а для π -электрона $\sqrt{2}$ [45]. Из соотношений (2, 3) следует, что электронный объем жесткой молекулы равен:

$$V = \sum_{j=1}^{N_i} V_j \quad (4)$$

Величиной V_j является электронный объем j -го атома жесткой молекулы, пропорциональный кубу ковалентного радиуса атома [11].

Электронный объем газа s - и p -электронов, составляющих внешние оболочки атомов, рассчитывается следующим образом:

$$V = N_\sigma + N_\pi \sqrt{2}, \quad (5)$$

где N_σ, N_π – числа σ - и π -электронов ковалентных связей молекулы за исключением некоторых наиболее удаленных связей, подчиняющихся правилу экранирования электронов, о чем сказано ниже.

Жесткие молекулы – это частный случай молекул. Чаще всего молекулы являются *нежесткими*, т.е. имеют одну и/или более нежесткую связь. Соединенные нежесткой связью фрагменты такой молекулы называются жесткими фрагментами. Энергии жестких фрагментов одной молекулы не зависят друг от друга, поэтому сумма потенциальных энергий жестких фрагментов молекулы равна общей потенциальной энергии молекулы. Для обобщенных зарядов следует тот же вывод: $Q_{1+2} = Q_1 + Q_2$. При превышении величины колебательно-вращательной энергии фрагмента жесткость связи в молекуле нарушается [42].

Другой случай связан с делокализованными π -электронами, которые из-за их подвижности не включаются в жесткий фрагмент, содержащий порождающие их атомы. Для такой молекулы рассматривается единый электронный «жесткий фрагмент». У группы с жесткими связями число делокализованных π -электронов равно половине числа π -электронов всех атомов, путь от которых до оси симметрии, проведенной по связям, содержит половину простой связи и не равен 0. У жесткой молекулы объем (4) делится на две части: объем делокализованных π -электронов (равный $\pi_d \sqrt{2}$, где π_d – половина числа мезомерных электронов), и объем оставшихся электронов. Формула для расчета ОЗ жесткого фрагмента с делокализованными электронами имеет вид [34, 37]:

$$Q = (V - \pi_d \sqrt{2})^{3/4} + (\pi_d \sqrt{2})^{3/4}. \quad (6)$$

Формула (6) применяется только к симметричным фрагментам, т.к. асимметричные фрагменты не имеют делокализованных электронов. Таким образом, для общего случая жесткой молекулы электронный объем V будет равен:

$$V = N_\sigma + N_\pi \sqrt{2} - s, \quad (7)$$

где s – число экранированных электронов, отстоящих от точки взаимодействия дальше радиуса экранирования.

Таким образом, формулы (6, 7) определяют обобщенный заряд в качестве молекулярного дескриптора.

Экранирование электронов. Эффект экранирования ограничивает электронный объем и, следовательно, обобщенный заряд молекулярного фрагмента [36, 42]. Ограничивает область распределения электрона в стационарном состоянии радиус Вигнера-Зейтца, являющийся радиусом экранирования [37]. В поле с потенциалом E_1/e он рассчитывается по следующей формуле [46]:

$$r_s = 1.710e\sqrt{a_0/E_1}, \quad (8)$$

где r_s – радиус экранирования электрона связи, e – элементарный заряд, a_0 – радиус Бора, E_1 – модуль потенциальной энергии электрона связи. Если энергия определяется в кДж/моль, а расстояние в нм, то величина радиуса экранирования будет равна $r_s = 4.697E_1^{-1/2}$, согласно чему значения радиуса экранирования попадают в область 0.3-0.4 нм [17] (таблица 1).

Число экранированных электронов s в условиях теплового движения определяется как среднее число электронов, удаленных от границы молекулы дальше, чем их радиус экранирования. Так как энергия электронов внутренних оболочек атомов гораздо больше энергии электронов ковалентных связей, то получающиеся в соответствии с формулой (8) короткие радиусы экранирования исключают их участие в межмолекулярных взаимодействиях [47]. Если обозначить расстояние от атома до границы молекулы как R , то участие его валентных электронов в ММВ при условии, что рассматриваемый участок границы молекулы лежит в ее плоскости контакта, определяется неравенством $R \leq r_s$. В случае плоских молекул это неравенство выполняется для всех валентных электронов, однако в случае существования атомов, нарушающих планарность молекулы, число экранированных электронов имеет ненулевое значение. Так, для разветвленных молекул

углеводородов было установлено эмпирическое правило:

$$s = m_3 + bm_4, \quad (9)$$

где m_3, m_4 – числа трех- и четырехзамещенных атомов углерода (C), соответственно, b – число электронов, экранирующихся на одном четырехзамещенном атоме C. В работе [46] найдены значения для неопентана $b=3$, для 2,2,3,3-тетраметилбутана $b=4$; для 2,3,3,4-тетраметилпентана $b=5$.

Связь обобщенного заряда с физическими величинами. При описании ММВ ТОЗ позволяет сократить число параметров, которые могут быть рассчитаны *ab initio*, а прозрачность и простота исходных положений позволяет добиться большей точности. Ввиду отсутствия подгоночных параметров полученные выражения для межатомных взаимодействий позволяют количественно описать сложные физико-химические явления. Посредством молекулярной статистики и ТОЗ разработан неэмпирический метод расчета термодинамических характеристик адсорбции, эффективность которого была доказана примерами теоретического расчета сложных систем и обнаружением тонких эффектов топологического и конформационного характера [11, 29, 32-35, 37, 40-42, 46].

Поляризуемость. Сравнивая коэффициенты дисперсионной энергии, полученные по ТОЗ и по теории Лондона, получаем связь обобщенного заряда с электронной поляризуемостью молекулы α_M [43]:

$$\alpha_M = aQ, \quad (10)$$

которая для органических молекул, содержащих помимо углерода еще водород, азот, кислород, фтор, хлор или бром, характеризуется константой $a = 4.948a_0^3$ [11].

Если рассматривать ОЗ как компоненты триплета для молекулы, состоящей из нескольких жестких фрагментов [11], и представив величину поляризуемости (10) в молярных единицах, получим величину молярной рефракции:

Таблица 1. Радиусы экранирования для связей (выделены чертой) в некоторых соединениях [11]
Table 1. Screening radii for bonds (highlighted) in some compounds [11]

Связь и соединение	Энергия связи $2E_1$, кДж/моль [47-48]	Радиус экранирования, нм
CF ₃ -F	540	0.286
CH ₃ -F	469	0.307
C ₆ H ₅ -F	510	0.294
CCl ₃ -Cl	307	0.379
CH ₃ -Cl	350	0.355
C ₆ H ₅ -Cl	392	0.335
H-OH	499	0.297
F ₃ C-CF ₃	402	0.331
C ₂ H ₅ -CH ₃	354	0.353
C ₆ H ₅ -CH ₃	414	0.326
F ₃ C-H	444	0.315
H ₃ C ₂ -H	410	0.328
H ₅ C ₆ -H	457	0.311
C ₆ H ₅ H ₂ C-H	356	0.352

$$R_M = \left(\frac{4\pi N_A}{3}\right) \alpha_M = 1.847 \left(\frac{Q_M}{e}\right) = 1.847 \sum_f V_f^{3/4} \text{ (см}^3\text{/моль)}, \quad (11)$$

где N_A – число Авогадро.

Сравнение рассчитанных по формуле (11) констант молекулярной рефракции с экспериментальными значениями дано в таблице 2.

Связь обобщенного заряда с физическими величинами позволяет экспериментально определить параметры для гетероатомов.

Молекулярная площадка. Потенциал адсорбента $u_A = Q_A u_b$ в соответствии с (1) не зависит от свойств адсорбата, а энергия адсорбции группы изолированных молекул пропорциональна сумме их ОЗ с коэффициентом u_A :

$$X = u_A Q_X N_X, Y = u_A Q_Y N_Y$$

где N_X, N_Y – числа молекул в соответствующих гомогенных монослоях. С другой стороны, где $w_X N_X = w_Y N_Y = S$ – площадь, занимаемая одной молекулой типа «X» или «Y», соответственно, на поверхности адсорбента (S). Получаем, что ОЗ пропорционален молекулярной площадке:

$$w \propto Q. \quad (12)$$

Эта пропорциональность впервые была использована для оценки константы Генри углеводородов на ГТС [29, 43].

Коэффициент пропорциональности в (12) $v = w/Q$ где для мономолекулярной адсорбции равен $v_0 = \frac{\pi}{4} r_b V_b^{-3/4} = 9.939 a_0^2$, где $r_b = 6.505 a_0, V_b = 5$. Откуда получаем

$$w_0 = 9.939 a_0^2 Q = 0.0278 Q \text{ (нм}^2\text{)}. \quad (13)$$

Молекулярная площадка превышает w_0 в $2\sqrt{3}/\pi = 1.103$ раз в случае плотноупакованных сфер.

В таблице 3 представлены величины молекулярных площадок для некоторых веществ.

Плотность. Через среднюю плотность ρ_M оценивается величина электронного объема макромолекулы V_M . Он ограничен сферой экранирования электронов, центром этого поля является рассматриваемая точка ван-дер-ваальсова поля. Для случая центра, расположенного на плоской границе полубесконечного тела, V_M ограничивается полусферой [11]:

$$V_M = \frac{2\pi r_s^3 V_1 \rho_M}{3m_1}, \quad (14)$$

Таблица 2. Константы молекулярной рефракции для некоторых веществ [11]*

Table 2. Molecular refraction constants for some substances [11]

Вещество	V	Константа рефракции	
		Экспериментальный результат	Теоретический расчет
3-гидроксипропаналь	28	21.9	22.5
ацетон	20.82	16.2	18
бензол	32.46	26.1	25.1
бромформ	41	29.8	29.9
1-хлорбутан	32	25.4	24.8
1,1,2,2-тетрафтор- 1,2-дихлорэтан	26	24.5	21.3

*электронные объемы для атомов: C(sp³) = 4, C(sp²) = 4.41, H=1, O(гидроксил)=2, O(карбонил)=2.41, N(амин)=3, F=1, Cl=7, Br=12.

Таблица 3. Молекулярные площадки некоторых веществ (10⁻² нм²) [11]

Table 3. Molecular sites of some substances (10⁻² nm²) [11]

Вещество	V	Теоретический расчет: 1.1W ₀	Эксперимент
Диоксид углерода	9.66	16.8	17.1
Этан	14	22.1	22.7
Этилен	14.83	23.1	22.6
Бутанол	28	37.3	38
н-Бутан	26	35.2	40
Бензол	35.19	44.2	40

где m_1, V_1 – масса и электронный объем мономера, r_s – радиус экранирования (8).

Выражение, связывающее плотность и обобщенный заряд выглядит следующим образом [46]:

$$\rho = \kappa \frac{M}{wN_A} = 0.1735\kappa \frac{M}{Q} \text{ (г/см}^3\text{)}, \quad (15)$$

где κ – доля молекул в объеме фазы (максимальное значение равно 0.74) [46] M – молекулярная масса, W – объем молекулы (равен объему прямого цилиндра с основанием в виде молекулярной площадки (13) и с высотой, равной константе 0.344 нм [11]) $W = wr_b = 9.57 \cdot 10^{-3} Q \text{ нм}^3$ (таблица 4).

Индекс Ковача. Данные хроматографических экспериментов могут быть использованы для определения обобщенного заряда и числа экранированных электронов s [50]. В работе [51-52] выведена приближенная связь между индексами Ковача I и величиной обобщенного заряда:

$$Q \approx (0.06I + 2)^{3/4}. \quad (16)$$

Для разветвленных алканов из нее следует выражение:

$$s \approx 6n - 0.06I \quad (17)$$

где n – число атомов углерода.

Применять формулы (16) и (17) для других классов веществ необходимо с осторожностью, как как индекс Ковача отражает не только адсорбцию, но и различные специфические взаимодействия [11, 39, 53].

Средняя энергия связи. Неподвижная фаза представляет собой плотную жидкую среду. Площадь области взаимодействия неподвижной фазы с молекулой аналита меньше всей площади поверхности молекулы НФ [17]. Здесь необходимо рассматривать область внутри плотной среды, ограниченную в случае адсорбции сферой экранирования, а в случае адсорбции - полусферой того же радиуса. Отметим, что, переходя из газовой среды в растворенное состояние молекула должна преодолеть потенциальный барьер, свя

Таблица 4. Плотности жидких углеводородов по формуле (15) при $\kappa = 0.7$ [46]
 Table 4. Densities of liquid hydrocarbons by formula (15) at $\kappa = 0.7$ [46]

Вещество	Расчет, г/см ³	Эксперимент, г/см ³
н-Бутан	0.612	0.60
изо-Пентан	0.666	0.620
н-Пентан	0.650	0.626
н-Гексен	0.682	0.673
н-Гексан	0.682	0.660
н-Гептен	0.711	0.697
н-Гептан	0.711	0.684
Октен-1	0.736	0.715
н-Октан	0.736	0.703
н-Нонан	0.759	0.718
н-Декан	0.780	0.730

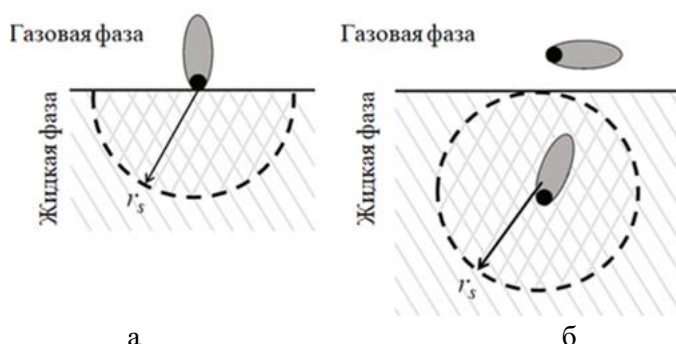


Рис. 1. Механизмы взаимодействия сорбата с жидкой неподвижной фазой: а – адсорбция и б – абсорбция. Обозначения: жирная линия – поверхность раздела фаз (жидкая фаза выделена серой штриховкой), пунктир – границы полусферы и сферы экранирования (выделены двойной штриховкой)

Fig. 1. Mechanisms of interaction between sorbate and liquid stationary phase: (a) adsorption and (b) absorption. Designations: bold line: interface (liquid phase is marked with grey shading), dashed line: boundaries of hemisphere and screening sphere (marked with double shading).

занный с работой против сил поверхностного натяжения по увеличению объема жидкости на собственный объем. Такой переход не всегда возможен. Варианты взаимодействия молекулы анализата и неподвижной фазы по двум механизмом представлены на рисунке 1.

Обобщенный заряд поверхности неподвижной фазы представляет собой максимальную величину Q_s . Максимальное значение обобщенного заряда при $\sum V_j = const$ (4), ограниченном радиусом экранирования (8), следует из равенства вкладов всех молекул, попадающих в полусферу экранирования: $V_0 = \frac{1}{N} \sum V_j$. Формула для расчета следующая:

$$Q_s = NV_0^{3/4} = \alpha NQ, \quad (18)$$

где Q – ОЗ единичной молекулы НФ. Разделив объем W_s на объем молекулы с учетом плотности укладки ($\kappa \approx 0.7$), получим количество молекул в полусфере экранирования:

$$N = \kappa \frac{W_s}{W} = \frac{1}{3Q} \left(\frac{e^2}{a_0 E_1} \right)^{3/2},$$

откуда согласно (18) [46]:

$$Q_s = \frac{\alpha}{3} \left(\frac{e^2}{a_0 (2E_1)} \right)^{3/2} \quad (19)$$

где коэффициент α имеет вид:

$$\alpha = \left(\frac{V_0}{V_0 - s} \right)^{3/4} = \frac{(Q^{4/3} + s)^{3/4}}{Q}, \quad (20)$$

где V_0 – электронный объем молекулы, s – число экранированных электронов.

В выражении (19), стоит коэффициент 2 у средней энергии электрона связи E_1 , потому что в работе [46] в этой формуле

обозначение было использовано для средней энергии простой ковалентной связи, которая равна удвоенной энергии электрона связи.

Аддитивность электронной плотности пропорциональна числу электронов связей и обратно пропорциональна радиусу экранирования в кубе и должна учитываться при усреднении энергии. Из этого следует:

$$E_1^{3/2} = N^{-1} \sum_{i=1}^{N_b} z_i (E_{bi}/z_i)^{3/2}, \quad (21)$$

где $N_b = N_\sigma/2$ – число ковалентных связей в молекуле, попадающих в сферу экранирования; E_{bi} и z_i – энергия и удвоенная кратность i -той ковалентной связи; $N = N_\sigma + N_\pi = \sum_{i=1}^{N_b} z_i$.

Как показано в работе [45], вариантом уравнения (21) для алканов, с учетом экранирования электронов (10), является формула:

$$E_1(n, m_3, m_4) = 0.04346 \frac{e^2}{a_0} \left(1 + \frac{1.071m_3 + (5.636-b)\sqrt{2}m_4 + 12.80}{3n+1} \right)^{2/3} \quad (22)$$

где m_3, m_4 – соответственно числа трех- и четырехзамещенных атомов углерода; b – параметр, принимающий значения в диапазоне от 3 до 5.

В работе [6] выводится параметрическая зависимость величины обобщенного заряда (19) от молекулярной массы полимера. Формулы (19) и (22) применимы для всех типов хроматографических жидких неподвижных фаз, в том числе ионных жидкостей [9].

Методика расчета. Общая схема

Обобщенный заряд одиночных молекул в газовой фазе и молекул в конденсированной фазе рассчитывается по представленной на рисунке 2 блок-схеме. Слева на схеме обозначен расчет одиночных молекул, справа – молекул конденсированной фазы (например, газохроматографической неподвижной фазы).

Расчет обобщенного заряда одиночных молекул в газовой фазе. Для расчета ОЗ необходима только структурная формула молекулы. Тогда, соответственно

схеме, расчет производится в следующем порядке:

1) Определяется фрагментное строение молекулы. Если ее колебательно-вращательная энергия превышает барьеры вращения по каким-либо связям, то эти связи – нежесткие, разделяющие молекулу на жесткие фрагменты. В противном случае молекула считается жесткой. Далее описан расчет для каждого жесткого фрагмента.

2) Экранирование электронов. Рассчитывается радиус экранирования электрона по формуле (8) через его энергию, определяемую по энергии связи с его участием.

3) Расчет числа экранированных электронов. Для алкильных участков применяли формулу (9). Для силанов учитывали вклад атомов кремния, равный 3.

4) Подсчет числа валентных электронов по формуле (7). По два валентных электрона на ковалентную связь: σ –связь – σ –электронами с суммарным V_i , равным 2, π –связь – π –электронами с V_i равным, соответственно, $2\sqrt{2}$. При расчете исключаются экранированные электроны s .

5) Расчет обобщенного заряда по формуле (3) $Q = V^{3/4}$.

Для нежесткой молекулы обобщенный заряд складывается из обобщенных зарядов ее жестких фрагментов.

Расчет обобщенного заряда конденсированной фазы (жидкости). При рассмотрении молекул жидкости или неподвижной фазы (чаще всего представленных полимерами) расчет через электронный объем (7) нецелесообразен – из-за большого размера молекулы величина обобщенного заряда Q будет завышена. На блок-схеме справа обозначен порядок расчета обобщенного заряда для таких случаев:

1) Для удобства приближенного расчета размеров сферы экранирования внутри жидкой фазы определяется величина средней энергии (21), для которой можно использовать справочные данные



Рис. 2. Блок-схема порядка расчета обобщенного заряда для молекул в газовой среде (слева) и молекул конденсированной фазы (справа).

Fig. 2. Block diagram of the procedure for calculating the generalised charge for molecules in the gas medium (left) and molecules of the condensed phase (right).

по энергиям связей в молекуле. Для алканов удобна формула (22), не требующая справочных данных.

2) Расчет радиуса экранирования (8) и коэффициента α (20), учитывающего экранирование.

3) Расчет обобщенного заряда по формуле (19) $Q_s = \frac{\alpha}{3} \left(\frac{e^2}{a_0 E_1} \right)^{3/2}$.

Обсуждение результатов

Расчет обобщенного заряда простых эфиров как молекул газовой фазы. В качестве примера расчета взяты молекулы изомеров простых эфиров с числом атомов углерода (С) равным 8, их структуры представлены на рисунке 3. Данные молекулы считаются жесткими.

Последовательность расчета обобщенного заряда по формуле (3):

1) Считается число валентных электронов – электронов, образующих связи. У атомов С – 4 электрона, у водорода (Н) – 1 электрон, у кислорода (О) – 2 электрона. Проще говоря, число электронов можно рассчитать, умножив на 2 количество связей в молекуле. Таким образом, получается по 52 валентных электрона на каждый изомер.

2) Считается число экранированных электронов s . Для расчета применяется

простое правило (9) $s = m_3 + b m_4$: при наличии в молекуле трехзамещенного атома С, обозначенного m_3 , величина s равна 1, то есть экранируется один электрон, а при наличии в молекуле четырехзамещенного атома С (m_4) экранируется уже 3 электрона и, соответственно, s равно 3 (т.е. $b=3$); данное правило учитывается для каждого трех- или четырехзамещенного атома в молекуле. Если в молекуле отсутствуют атомы С m_3 и m_4 параметр s будет равен 0. Для молекул, представленных на рисунке 3 получаются разные значения s для каждого из изомеров.

3) Расчет электронного объема представленных изомеров (7).

4) Рассчитывается обобщенный заряд Q для каждой молекулы по формуле (3).

Результаты расчета приведены в таблице 5.

Таким образом, без применения специальных программ можно быстро оценить величину обобщенного заряда отдельных молекул.

Расчет обобщенного заряда конденсированной фазы (жидкости). В качестве примера изменения величины обобщенного заряда в зависимости от того в какой фазе находятся молекулы (газовой фазы

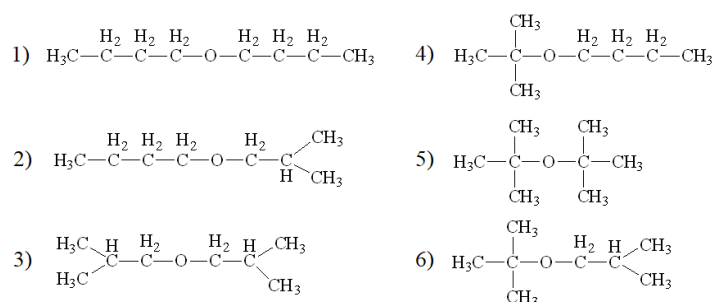


Рис. 3. Изомеры простых эфиров с числом атомов углерода равным 8 в предположении конформации транс-зигзаг для линейных участков

Fi. 3. Isomers of ethers with the number of carbon atoms equal to 8, assuming a trans-zigzag conformation for linear sections

или жидкой) рассмотрим представленные выше изомеры простых эфиров в конденсированной среде. Порядок расчета следующий:

1) Определение средней энергии электрона связи (21). Очевидно, что средняя энергия электрона связи может быть рассчитана как среднее арифметическое энергий электронов всех связей в молекуле с учетом их кратности (т.е. энергия простых связей делится на 2, двойных связей – на 4, энергия тройных связей, соответственно, на 6). По структурной формуле молекулы это легко рассчитать. Небольшая неточность в этом расчете заключается в самом определении энергии связи – разные источники могут содержать разные величины энергий, однако, обычно погрешность не превышает 20 кДж/моль и ею можно пренебречь.

Величины энергий связей $2E_1$, представленные в различных литературных источниках, приведены в таблице 5.

2) Расчет числа экранированных электронов s . Следуя правилу (9) $s = m_3 + bm_4$, по структурам изомеров определяем, что у молекулы №1 – отсутствуют экранированные электроны, у молекулы №2 – 1 экранированный электрон и т.д.

3) Расчет радиуса экранирования (8) и коэффициента α (20). В формулу (20) подставляется соответствующее значение s , рассчитанное в предыдущем пункте.

4) Расчет обобщенного заряда. Сначала рассчитывается ОЗ (19) при $\alpha = 1$,

затем полученное значение Q подставляется в формулу (20) для корректировки величины α . Далее по формуле (19) определяется исправленный обобщенный заряд жидкости.

Результаты расчета обобщенного заряда для представленных изомеров простых эфиров как молекул газовой фазы по формуле (3) и как молекул жидкости (19) представлены в таблице 6.

Нами рассмотрено несколько групп соединений, включающих в себя вещества, используемые в качестве газохроматографических неподвижных фаз. Структуры изученных соединений приведены на рисунке 4.

Для хроматографических неподвижных фаз расчет ОЗ производится также как мы рассчитывали ОЗ для конденсированной фазы изомеров простых эфиров. Например, для НФ Сквалан (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракозан) средняя энергия электрона связи E_1 рассчитывается из структуры по формуле (22) [46]. Далее, по формуле (19), находим обобщенный заряд при $\alpha = 1$, он равен $Q = 12.08$. Далее величина α корректируется с учетом 6 трехзамещенных атомов С ($s=6$). И, наконец, исправленное значение коэффициента $\alpha = 1.16$ подставляется в формулу (19) и пересчитывается обобщенный заряд $Q = 13.99$. Тот же расчет для полидиметилполисилоксана, дает при $\alpha = 1.29$, соответственно, $Q = 7.46$. Аналогично рассчитывается

обобщенный заряд любой конденсированной фазы. Результаты расчета по формуле (19) представлены в таблице 7.

Заключение

Предложенный метод расчета параметра молекул, определяющий их способность

Таблица 5. Энергии связей
 Table 5. Bond energies

Связь	Энергия связи $2E_1$, кДж/моль	Источник	Связь	Энергия связи $2E_1$, кДж/моль	Источник
C-C (метил)*	369.0	[48]	C-Si	318.0	[55]
C-C (бутил)**	342.0	[54]	O-O	150.5	[55]
C=C	600.0	[55]	O-H	460.0	[57]
C-H (метил)*	410.0	[55]	S-O	348.0	[55]
C-H (бутил)**	339.0	[56]	S=O	522.0	[55]
C-O	340.0	[48]	Si-H	364.0	[57]
C=O	690.0	[48]	Si-O	451.9	[55]
C-S	301.0	[55]	N-N	56.8	[48]
C-N	319.0	[55]	N=N	455.6	[48]
C=N	643.7	[56]	NH	386.0	[55]
C≡N	870.0	[55]	N-O	200.0	[55]
C-Cl	327.3	[57]	N=O	480.7	[55]
C-F	452.0	[57]			

*имеются ввиду связи в концевых группах $-CH_3$; **имеются ввиду связи в углеродной цепи, в группах $-CH_2-$

Таблица 6. Обобщенные заряды изомеров простых эфиров с числом атомов углерода равным 8 в предположении конформации транс-зигзаг для линейных участков, рассчитанные для отдельных молекул в газовой среде (3) и молекул жидкости (19)

Table 6. Generalised charges of ether isomers with the number of carbon atoms equal to 8, assuming a trans-zigzag conformation for linear sections, calculated for single molecules in gas (3) and liquid molecules (19)

№ изомера	Расчет обобщенных зарядов (3)			Расчет обобщенных зарядов (19)		
	V	s	Q	$2E_1$	α	Q
1	52	0	19.36	286.36	1.00	9.25
2	52	1	19.08	291.52	1.04	9.37
3	52	2	18.80	296.65	1.08	9.49
4	52	4	18.52	304.15	1.13	9.53
5	52	6	17.66	321.44	1.28	9.96
6	52	4	18.24	309.17	1.18	9.69

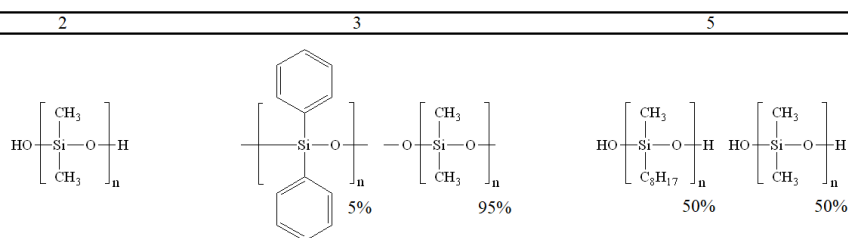


Рис. 4. Структурные формулы некоторых рассматриваемых соединений. Нумерация соответствует таблице 7.

Fig. 4. Structural formulae of some of the studied compounds. The numbering corresponds to Table 7.

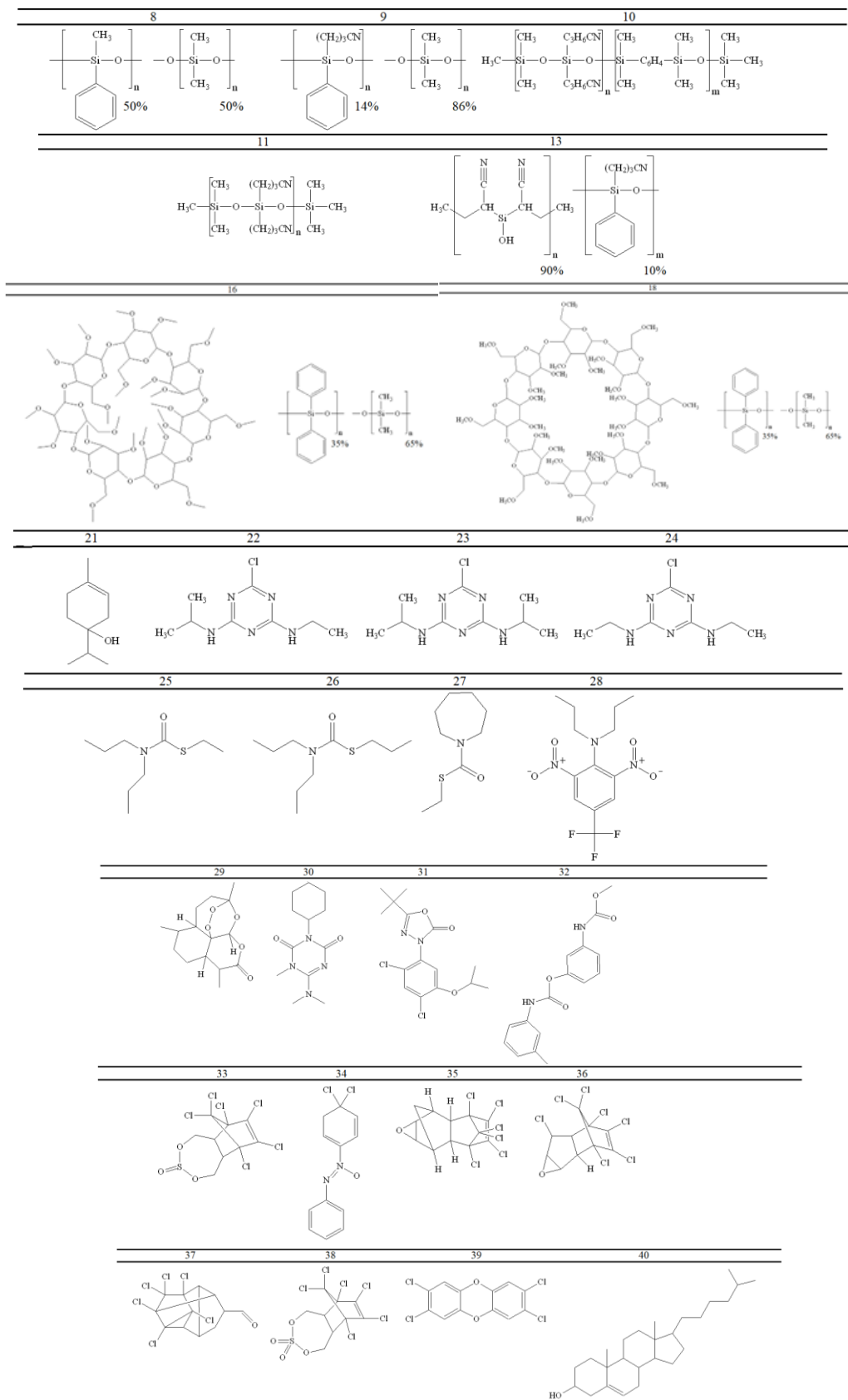


Рис. 4. (продолжение)

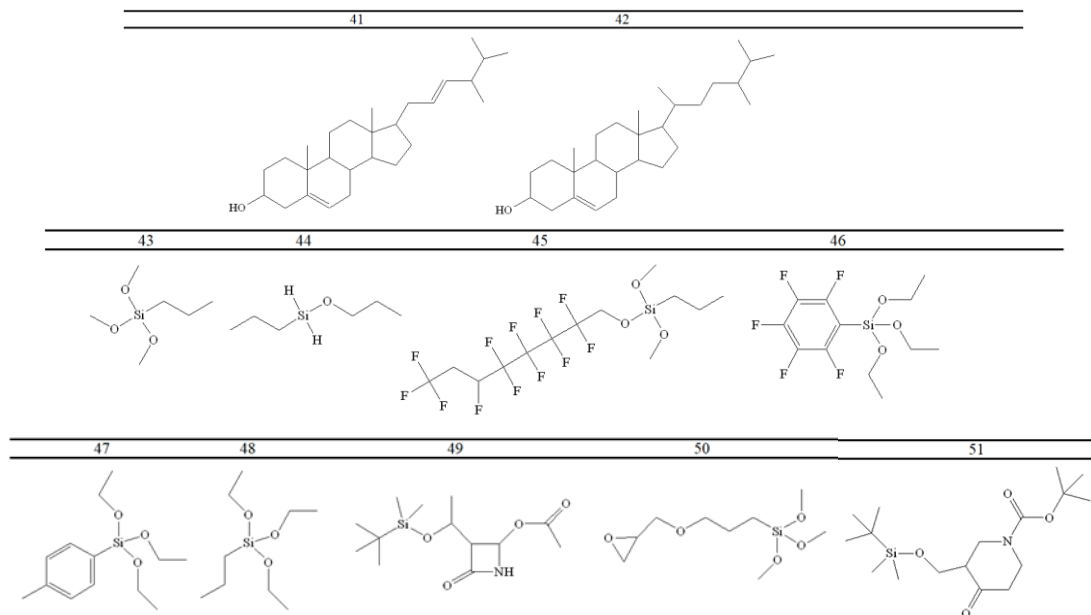


Рис. 4. (продолжение)

Таблица 7. Обобщенные заряды молекул

Table 7. Generalised charges of molecules

№	Название	α	$2E_1$	Q
1	2	3	4	5
1	2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosan	1.16	239.69	14.01
2	poly(dimethylsiloxane)	1.21	391.84	6.99
3	poly(5% diphenyl/95% dimethylsiloxane)	1.21	391.20	7.01
4	poly(35% diphenyl/65% dimethylsiloxane)	1.21	387.45	7.09
5	poly(50% n-octyl/50% methylsiloxane)	1.20	374.71	7.37
6	poly(20% diphenyl/80% dimethylsiloxane)	1.21	389.33	7.05
7	poly(50% diphenyl/50% dimethylsiloxane)	1.20	385.57	7.13
8	poly(50% phenyl/50% methylsiloxane)	1.20	378.30	7.29
9	poly(14% cyanopropylphenyl/86% dimethylsiloxane)	1.21	388.30	7.07
10	bis(cyanopropylsiloxane)-co-methyl-silarylene (HP-88)	1.19	365.50	7.59
11	100% Cyanopropyl Polysiloxane	1.19	368.67	7.51
12	(50% cyanopropylphenyl)methylpolysiloxane	1.20	379.20	7.27
13	stabilized poly(90% biscyanopropyl/10% cyanopropyl-phenylsiloxane)	1.19	366.25	7.57
14	poly(80% biscyanopropyl/20% cyanopropylphenyl siloxane)	1.18	365.96	7.58
15	poly(biscyanopropyl siloxane)	1.18	363.66	7.64
16	β -DEX 120 (20% permethylated β -cyclodextrin in SPB-35 poly(35% diphenyl/65% dimethylsiloxane)	1.19	367.85	7.53
17	β -DEX 110 (10% permethylated β -cyclodextrin in SPB-35 poly(35% diphenyl/ 65% dimethylsiloxane)	1.18	365.40	7.59
18	20% permethylated gamma-cyclodextrin in SPB-35 poly(35% diphenyl/65% dimethylsiloxane)	1.19	366.80	7.56
19	Poly(3,3,3-trifluoropropylmethylsiloxane)	1.21	389.46	7.04
20	Silyl[(6-O-tert-butyl dimethyl)-2,3,-di-O-acetyl]- β -cyclodextrin	1.18	362.35	7.67
21	terpinen-4-ol	1.00	364.00	6.46
22	Atrazin	1.00	361.14	6.53
23	Propazin	1.00	368.75	6.33
24	Simazin	1.00	354.10	6.73
25	S-Ethyl-N,N-dipropylthiocarbamat	1.00	359.17	6.59



1	2	3	4	5
26	Vernam	1.00	357.42	6.63
27	Molinate	1.00	343.41	7.04
28	trifluralin	1.00	338.04	7.21
29	Artemisinin	1.00	352.08	6.79
30	Hexazinone	1.00	355.23	6.70
31	Oxadiazon	1.00	351.24	6.81
32	Phenmedipham	1.00	331.15	7.44
33	Endosulfan	1.00	330.10	7.47
34	4,4'-Dichloroazoxybenzene	1.00	293.60	8.91
35	Dieldrin	1.00	333.10	7.37
36	Heptachlor epoxide	1.00	331.85	7.41
37	Endrin aldehyde	1.00	339.05	7.18
38	Endosulfan sulfate	1.00	327.63	7.56
39	(2,3,7,8 / 1,4,7,8 / 1,2,3,4 / 1,2,3,7 / 1,2,3,8) Tetrachlorodibenzo-P-dioxin	1.00	303.22	8.49
40	Cholesterol	1.00	355.15	6.70
41	Brassicasterol	1.00	351.89	6.79
42	Campesterol	1.00	357.95	6.62
43	trimethoxy(propyl)silane	1.21	387.22	7.09
44	Propyl(propoxy)silane	1.18	366.60	7.56
45	Dodecafluoroheptylpropyltrimethoxysilane	1.21	394.11	6.95
46	Triethoxy(perfluorophenyl)silane	1.19	372.50	7.42
47	Triethoxy(p-tolyl)silane	1.19	371.95	7.43
48	Triethoxy(propyl)silane	1.21	386.70	7.10
49	(2R,3R)-3-((R)-1-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-4-oxoazetidin-2-yl acetate	1.20	377.70	7.30
50	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane	1.19	366.90	7.58
51	tert-Butyl 3-(((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)methyl)-4-oxopiperidine-1-carboxylate	1.19	372.99	7.41

к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям, базируется на сведениях о пространственном строении молекул и энергии ковалентных связей. Приведены приближенные соотношения, связывающие обобщенные заряды с индексами хроматографического удерживания, молекулярной площадкой и поляризуемостью. Даны результаты расчета обобщенных зарядов для изолированных молекул и для конденсированных сред, представля-

ющих собой сложные органические вещества, ионные жидкости, применяемые в качестве хроматографических неподвижных фаз.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Dolgonosov A.M., Zaitceva E.A. Kharakteristika polyarnosti nepodvizhnoj fazy v gazovoj chromatografii na osnove teoreticheskogo opisaniya mezhmolekulyarnyh vzaimodejstvij. I. Sluchaj otsutstviya vodorodnyh svyazey. *Sorbtsionnyye I khromatograficheskiye protsessy*. 2014; 14(4): 578-590. (In Russ.)

2. Dolgonosov A.M., Zaitceva E.A. Kharakteristika polyarnosti nepodvizhnoj fazy v gazovoj chromatografii na osnove teoreticheskogo opisaniya mezhmolekulyarnyh vzaimodejstvij. II. Sluchaj vodorodnyh svyazey. *Sorbtsionnyye I khromatograficheskiye protsessy*. 2015; 15(3): 321-320. (In Russ.)

3. Zaitceva E.A., Dolgonosov A.M. Teoreticheskaya ocenka kharakteristik selektivnosti



- gazochromatograficheskikh nepodviznykh faz. *Sorbtsionnye I khromatograficheskiye protsessy*, 2018; 18 (5): 676-689. (In Russ.)
4. Zaitceva E.A., Dolgonosov A.M. Trekhparametricheskaya model' mezhmolekulyarnykh vzaimodeystviy kak osnova dlya klassifikatsii i vybora nepodviznykh faz dlya gazovoy khromatografii. *Sorbtsionnye I khromatograficheskiye protsessy*, 2019; 19(5): 525-541. (In Russ.)
 5. Dolgonosov A.M. Polyarnost' i gidrofil'nost' — fundamental'nye nezavisimye kharakteristiki khromatograficheskikh nepodviznykh faz. *Sorbtsionnye I khromatograficheskiye protsessy*, 2015; 15(3): 312-320. (In Russ.)
 6. Dolgonosov A.M., Zaitceva E.A. A model of intermolecular interaction associated with hydrogen bond formation and its application to the characterization of the selectivity of chromatographic phases on the example of polyethylene glycols. *Journal of Structural Chemistry*, 2020; 61: 1233-1243.
 7. Dolgonosov A.M., Zaitceva E.A. Factors determining the selectivity of stationary phases for geometric isomers of fatty acids in gas-liquid chromatographic analysis. *Journal of Analytical Chemistry*, 2020; 75: 1599-1607.
 8. Dolgonosov A.M., Zaitceva E.A. Selectivity map of stationary phases: a graphical method for systematizing and searching for conditions for the gas chromatographic separation of polar substances. *Journal of Analytical Chemistry*, 2021; 76: 898-906.
 9. Zaitceva E.A., Dolgonosov A.A., Dolgonosov A.M. Theoretical characterization of ionic liquids as stationary phases for gas chromatography. *Sorbtsionnye I khromatograficheskiye protsessy*, 2022; 22(5): 598-611. (In Russ.)
 10. Zaitceva E.A., Dolgonosov A.M. Method for the Selection of Polar Stationary Phases for Gas-Liquid Chromatography based on the Theory of Intermolecular Interaction, In: V.P. Kolotov, N.S. Bezaeva (eds) *Advances in Geochemistry, Analytical Chemistry, and Planetary Sciences: 75th Anniversary of the Vernadsky Institute of the Russian Academy of Sciences*. Springer, Cham. 2023, 495-508. https://doi.org/10.1007/978-3-031-09883-3_29
 11. Dolgonosov A.M. Model' elektronogo gaza i teoriya obobshchennykh zaryadov dlya opisaniya mezhatomnykh vzaimodeystviy i adsorbtsii. M., LIBROKOM. 2009. 176 p. (In Russ.)
 12. Dolgonosov A.M. A theory of generalized charges for describing interatomic interactions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2001; 75: 1659-1666.
 13. Reinganum M. Kräfte elektrischer Doppelpunkte nach der statistischen Mechanik und Anwendung auf molekulare und Ionenwirkungen. *Annalen der Physik*, 1912; 343: 649-668.
 14. Keesom W.H. Die van der Waalsschen Kohäsionskräfte. *Physikalische Zeitschrift* 1921; 22: 129-141.
 15. Debye P. Van der Waals cohesion forces. *Physikalische Zeitschrift*, 1920; 21: 178-187.
 16. Falkenhagen H. Kohäsion und Zustandsgleichung bei dipolgasen. *Physikalische Zeitschrift*, 1922; 23: 87-95.
 17. Dolgonosov A.M. A model of hydrogen bond formation between the molecules in vapor and liquid. *Journal of Structural Chemistry*, 2020; 20(61): 1045-1058. <https://doi.org/10.1134/S0022476620070069>
 18. Avgul' N.N., Kiselev A.V., Poshkus D.P. Adsorbtsiya gazov i parov na odnorodnykh poverhnostyakh, M., Khimiya, 1975. 384 p. (In Russ.)
 19. Kiselev A.V. Mezhmolekulyarnye vzaimodeystviya v adsorbtsii i khromatografii. M., Vyssh. shk., 1986. 360 p. (In Russ.)
 20. Buryak A.K. The use of molecular-statistical methods for the calculation of thermodynamic characteristics of adsorption for identification of organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry. *Russian Chemical Reviews*, 2002; 71(8): 695-706.
 21. Yashkina E.A., Yashkin S.N., Svetlov D.A., Gorshkov V.V. Thermodynamics of adsorption and patterns of the gas-chromatographic retention of cyclic amines on surfaces of graphitized thermal carbon black. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2015; 89(9): 1672-1682.
 22. Svetlov D.A., Sarkisova V.S., Yashkin S.N. Adsorption of isomeric aryl- and diadamantane molecules on the surface of graphitized thermal carbon black. *Izvestiya Akademii nauk, Seriya khimicheskaya*, 2011; 9: 1784-1788. (In Russ.)
 23. Abraham M.H., Ibrahim A., Zissimos A.M. Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements. *Journal of Chromatography A*, 2004; 1037: 29-47.
 24. Abraham M.H. Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application



- to physicochemical and biochemical processes. *Chemical Society Reviews*, 1993; 22: 73-83.
25. Abraham M.H., Du C.M., Platts J.A. Lipophilicity of the nitrophenols. *Journal of Organic Chemistry*, 2000; 65: 7114-7118.
26. Zaitceva E.A. Obzor metodov klassifikatsii nepodvizhnykh faz v gazovoy khromatografii. *Sorbtionnyye I khromatograficheskiye protsessy*, 2020; 20(2): 175-196. (In Russ.)
27. Minkin V.I., Simkin B.YA., Minyaev R.M. Teoriya stroeniya molekul. Rostov-na-Donu, Feniks, 1997. 560 p. (In Russ.)
28. Kaplan I.G. Intermolecular Interactions: Physical Picture, Computational Methods and Model Potentials. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, England, 2014. 312 p.
29. Dolgonosov A.M. Svyaz' mezhdu velichinoy molekulyarnoy ploshchadki i konstantoj Genri pri adsorbtsii organicheskikh molekul na nespecificheskom adsorbente. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, 1994; 68: 2187-2190. (In Russ.)
30. Dolgonosov A.M. Calculation of adsorption energy and Henry law constant for nonpolar molecules on a nonpolar uniform adsorbent. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998; 102: 4715-4730.
31. Dolgonosov A.M. Energy and Molecular Area of the Adsorbate on a Uniform Adsorbent. *Doklady Physical Chemistry*, 1998; 358(3): 355-359.
32. Dolgonosov A.M. Effect of the structure of unbranched molecules of hydrocarbons on their adsorption by a uniform surface. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 1998; 72: 101-106.
33. Dolgonosov A.M. Effect of the structure of branched molecules on characteristics of their chromatographic retention. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 1998; 72: 1281-1285.
34. Dolgonosov A.M. Calculation of the Henry constant for the adsorption of unsaturated and cyclic hydrocarbons on a uniform plane surface. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2001; 75: 327-335.
35. Dolgonosov A.M. A priori calculation of the adsorption properties of molecules from their topology. *Doklady Chem.*, 2001; 377: 89-93.
36. Dolgonosov A.M. The screening effect in interatomic interactions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2002; 76: 2015-2019.
37. Dolgonosov A.M. Description of adsorption in the Henry region in terms of generalized charge. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2002; 76: 993-998.
38. Dolgonosov A.M. Nespetsificheskaya selektivnost? v probleme modelirovaniya vysokoeffektivnoy khromatografii. M., KRASAND, 2012. 256 p. (In Russ.)
39. Dolgonosov A.M., Rudakov O.B., Surovcev I.S., Prudkovsky A.G. Kolonochnaya analiticheskaya khromatografiya kak ob"ekt matematicheskogo modelirovaniya, GEOHIRAN – Voronezhskij GASU, Voronezh, 2013. 467 p. (In Russ.)
40. Dolgonosov A.M. Effects of nonideal adsorption on the surface of a liquid stationary phase in gas chromatography. The sorption potential and capacity of the surface. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2006; 80: 960-964.
41. Dolgonosov A.M., Prudkovsky A.G. Effects of nonideal adsorption on the surface of a liquid stationary phase in gas chromatography. The degree of freedom restriction. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2006; 80: 964-969.
42. Dolgonosov A.M., Prudkovsky A.G. Barriers to intramolecular rotation determined from the temperature dependence of the Henry constant in the region of adsorbed molecule rigidity failure. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2008; 82: 812-820.
43. Dolgonosov A.M. A model for a general type of intermolecular interaction between a molecule and a liquid phase based on the theory of generalized charges. *Sorbtionnyye I khromatograficheskiye protsessy*, 2020; 20(3): 343-361. (In Russ.)
44. Dolgonosov A.M. Relation between adsorbate molecular area and Henry constant for adsorption of hydrocarbons on thermal carbon black. *Doklady Akademii Nauk*, 1994; 338: 39-42. (In Russ.)
45. Dolgonosov A.M. Effect of electronic degeneracy on interatomic interaction parameters. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, 2015; 60: 194-197.
46. Dolgonosov A.M. The surface tension coefficients and critical temperatures of uniform nonpolar liquids from a priori calculations within the framework of the theory of generalized charges. *Russian Chemical Bulletin*, 2016; 65(4): 952-963.
47. Dolgonosov A.M., Hypothesis for coordination number of critical fluid molecules expressed in model potential and critical tempera-



ture for simple substances. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2020; 139(90): 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00214-020-02590-3>

48. Gordon A., Ford R. Sputnik himika / Per. s angl. E. L. Rozenberga, S. I. Koppel'. M., Mir, 1976, 541 p. (In Russ.)

49. Spravochnik khimika. T. 1. Pod red. B.P. Nikol'skogo. M.: Himiya, 1966. 1069 p. (In Russ.)

50. Bogoslovskij Yu.N., Anvaer B.I., Vigdergauz M.S. Hromatograficheskie postoyannye v gazovoj hromatografii. Uglevodorody i kislorodsoderzhashchie soedineniya. Spravochnik, Gosstandart; GSSSD, Izd-vo standartov, M. 1978, 191 p. (In Russ.)

51. Dolgonosov A.M. Svyaz' energii adsorbtsii s indeksom Kovacha, vytekayushchaya iz teorii obobshchennykh zaryadov. *Sorbtsionnye I khromatograficheskiye protsessy*, 2015; 15: 168-178. (In Russ.)

52. Dolgonosov A.M. A nonlinear relation between adsorption enthalpy and a chromatographic retention index. *Protect. Metals & Phys. Chem. Surfaces*, 2015; 51: 951-956.

53. Dolgonosov A.M., Prudkovsky A.G. Mekhanizm raspredeleniya v gazo-zhidkostnoj

hromatografii, vklyuchayushchij effekt konformacionnoj perestrojki makromolekuly nepodvizhnoj fazy pri kontakte s molekuloj adsorbata. *Sorbtsionnye I khromatograficheskiye protsessy*, 2010; 10(6): 887-893. (In Russ.)

54. Yu-Ran Luo. De vinculum parentum provocant dissociationem per organicum industria comlibras [Handbook of bond dissociation energies in organic compounds]. Florida: Nabu Press, 2003. 1687 pp.

55. Lange's Handbook of Chemistry. Fifteenth Edition. J.A. Dean, ed., McGraw-Hill. 1998. 1291 p.

56. Gurvich L.V., Karachevcev G.V., Kondrat'ev V.N., Lebedev Yu.A., Medvedev V.A., Potapov V.K., Hodeev YU.S.. M., Energii razryva himicheskikh svyazey. Potencialy ionizatsii i srodstvo k elektronu. Nauka, 1974. 351 pp. (In Russ.)

57. CRC Handbook of Chemistry and Physics A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data, Izd. 97e, pod red. David R. Lide, Thomas J. Bruno. CRC Press Taylor & Francis Group. New York. 2016-2017. 2643 p.

Информация об авторах / Information about the authors

Е.А. Зайцева – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории сорбционных методов, Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук (ГЕОХИ РАН), Москва, Россия

А.М. Долгонос – д.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории сорбционных методов, Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук (ГЕОХИ РАН), Москва, Россия

E.A. Zaitceva – Ph.D., Senior scientific fellow, Laboratory of Sorption Methods, Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of Russian Academy of Sciences (GEOKHI RAS), Moscow, Russian Federation, e-mail: zaitceva@geokhi.ru

A.M. Dolgonosov – Dr. sci. (chem), Leading scientific fellow, Laboratory of Sorption Methods, Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of Russian Academy of Sciences (GEOKHI RAS), Moscow, Russian Federation, email: amdolgo@mail.ru

Статья поступила в редакцию 17.11.2023; одобрена после рецензирования 13.03.2024; принята к публикации 20.03.2024.

The article was submitted 17.11.2023; approved after reviewing 13.03.2024; accepted for publication 20.03.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.054:547.466

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12127

Определение 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты амперометрическим сенсором с молекулярно-импринтированными полимерами

Анастасия Олеговна Коровкина¹, Ву Хоанг Иен^{1,3},
Наталья Владимировна Белобородова², Антон Юрьевич Выборный¹,
Александр Николаевич Зяблов¹✉

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, alex-n-z@yandex.ru✉

²Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

³Пищевой Промышленный Университет Хошимина, Вьетнам

Аннотация. Сепсис представляет собой опасную для жизни органную дисфункцию, вызванную нарушением регуляции ответа организма на инфекцию. Если сепсис не распознать на ранней стадии и не начать лечение, он может привести к септическому шоку, полиорганной недостаточности и смерти. Диагностика сепсиса, традиционно основанная на клинической картине и обнаружении этиологически-значимых микроорганизмов в крови и очагах, в последние годы совершенствуется путем поиска и внедрения различных биомаркеров. Одним из перспективных биомаркеров сепсиса является 3-(4-гидроксифенил)молочная кислота (4-ГФМК). В работе разработан амперометрический сенсор, модифицированный полимером с молекулярным отпечатком (ПМО) гидроксифенилмолочной кислоты и показана принципиальная возможность определения 4-ГФМК данным сенсором в модельных водных растворах. Полимеры с молекулярными отпечатками активно используются в процессах разделения веществ, а также при получении селективных сенсоров. Среди многообразия селективных материалов особый интерес представляют полиимиды. Поэтому в работе на основе сополимера 1,2,4,5-бензолтетракарбонной кислоты с 4,4'-диаминодифенилоксидом были разработаны ПМО-сенсоры с отпечатком 4-гидроксифенилмолочной кислоты. Сенсоры получали в две стадии (I – стадия при температуре 80°C, II – стадия при 180°C) методом нековалентного импринтинга. Установлена высокая селективность ПМО-сенсоров по отношению к целевым молекулам. Диапазон определяемых концентраций кислоты составил 0.2-0.0002 мг/дм³. Экспериментально установленный предел обнаружения 4-гидроксифенилмолочной кислоты составил $4.5 \cdot 10^{-5}$ мг/дм³.

Ключевые слова: полимер с молекулярным отпечатком, 3-(4-гидроксифенил)молочная кислота, 4-ГФМК, сепсис, полиимид, амперометрический сенсор.

Для цитирования: Коровкина А.О., Ву Хоанг Иен, Белобородова Н.В., Выборный А.Ю., Зяблов А.Н. Определение 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты амперометрическим сенсором с молекулярно-импринтированными полимерами // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 227-235. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12127>

Original article

Determination of 3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid by an amperometric sensor with molecularly imprinted polymers

Anastasia O. Korovkina¹, Wu Hoang Yen^{1,3}, Natalia V. Beloborodova²,
Anton Yu. Vybornyi¹, Alexander N. Zyablov¹✉

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia, alex-n-z@yandex.ru✉

²Federal Scientific and Clinical Centre of Resuscitation and Rehabilitation, Moscow, Russia

³Food Industrial University Ho Chi Minh City, Vietnam

Abstract. Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by the dysregulation of the body's response to infection. If sepsis is not diagnosed early and treated, it can lead to septic shock, multi-organ failure, and death. The diagnosis of sepsis, traditionally relying on clinical findings and detection of aetiologically significant microorganisms in the blood and foci, has been improved in recent years by the search for and implementation of various biomarkers. One promising biomarker of sepsis is 3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid (HPLA). In this study, we developed an amperometric sensor modified with a molecularly imprint polymer (MIP) of hydroxyphenyl lactic acid and proved the fundamental possibility of determining HPLA by this sensor in model aqueous solutions. Molecularly imprinted polymers are widely used to separate substances and to produce selective sensors. Among the variety of selective materials, polyimides are of particular interest. Therefore, in this study, we developed MIP sensors imprinted with 4-hydroxyphenyl lactic acid on the basis of copolymer of 1,2,4,5-benzotetracarboxylic acid with 4,4'-diaminodiphenyloxide. The sensors were prepared in two stages (1st stage at 80°C, 2nd stage at 180°C) by non-covalent imprinting method. High selectivity of PMO-sensors towards target molecules was confirmed. The range of the determined concentrations of the acid was 0.2-0.0002 mg/dm³. The experimentally determined detection limit of 4-hydroxyphenyl lactic acid was 4.5 · 10⁻⁵ mg/dm³. **Keywords:** molecularly imprinted polymer, 3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid, HPLA, sepsis, polyimide, amperometric sensor.

For citation: Korovkina A.O., Wu Hoang Yen, Beloborodova N.V., Vybornyi A.Yu., Zyablov A.N. Determination of 3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid by an amperometric sensor with molecularly imprinted polymers. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 227-235. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12127>

Введение

Одной из самых актуальных проблем современной медицины является сепсис, от которого, по статистике, ежегодно умирают 11 миллионов человек. Кроме того, миллионы больных, перенесших его, становятся инвалидами. Сепсис представляет собой опасную для жизни органную дисфункцию, вызванную нарушением регуляции реакции организма на инфекцию. Если сепсис не распознать и не лечить на ранней стадии, органная дисфункция прогрессирует вплоть до полиорганной недостаточности, часто развивается септический шок с высокой вероятностью летального исхода [1-7].

Традиционно диагностика сепсиса определялась сочетанием клинических критериев и результатов микробиологических исследований [8-11]. Большинство существующих показателей воспалительного процесса, таких как температура тела, частота пульса и дыхания, являются неспецифическими показателями, ненадежны и часто могут приводить к ошибочной диагностике [12]. С начала 2000-х годов ведется интенсивный поиск биомаркеров для диагностики сепсиса, крайне актуальным является разработка чувствительных, экспрессных методов [8, 13]. Среди наиболее широко

используемых маркеров сегодня можно выделить прокальцитонин, С-реактивный белок и др. Концентрация таких соединений в крови повышается у больных с тяжелым сепсисом и септическим шоком, коррелирует со степенью поражения органов, но снижается по мере выздоровления, поэтому эти белки могут служить в качестве биомаркеров для диагностики и мониторинга сепсиса [10-12].

Биомаркерами могут выступать не только определенные белки и протеины, но и низкомолекулярные соединения. Показано, что среди низкомолекулярных метаболитов особый интерес представляют фенолсодержащие карбоновые кислоты (ФКК) и, в частности, 3-(4-гидроксифенил)молочная кислота (4-ГФМК) [14, 15]. Высокий уровень ФКК в сыворотке крови коррелирует с тяжестью клинических проявлений органных дисфункций и риском летального исхода. Выявлено многократное увеличение при сепсисе сывороточных концентраций фенольных метаболитов, и особенно 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты, по сравнению с фоновыми концентрациями [15, 16]. Известно, что в организме человека 4-ГФМК является продуктом эндогенного метаболизма ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина), с

другой стороны, 4-ГФМК является промежуточным продуктом бактериальной биодegradации тех же аминокислот, поэтому его можно назвать общим метаболитом для человека и бактерий. Накопление 4-ГФМК в крови при сепсисе можно расценить как отражение грубых метаболических нарушений во взаимодействии макро- и микроорганизмов. Уровень 4-ГФМК представляет большой медицинский интерес как показатель тяжести септического состояния, что определяет актуальность разработки экспресс-способов определения концентрации этого метаболита в крови пациентов [15]. Другим примером растущей востребованности биомаркера 4-ГФМК является клиническое исследование новых возможностей ранней диагностики бактериального менингита при осложненном течении послеоперационного периода у нейрохирургических пациентов. В этом случае исследовалась спинномозговая жидкость (ликвор) и было показано, что данные о концентрации 4-ГФМК по информативности могут опережать другие традиционные лабораторные тесты и биомаркеры [17].

В настоящее время для определения 4-ГФМК в крови используют метод газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Этот метод требует ступенчатой пробоподготовки, наличия в лаборатории дорогостоящего оборудования для ГХ-МС анализа, соответствующих специалистов, что ограничивает его применение [16, 18, 19]. Методами ГХ-МС и ВЭЖХ установлено, что концентрация 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты в крови здоровых людей находится строго в пределах 1-2.5 мкМ, валидированные референтные значения сывороточных концентраций 4-ГФМК 1.2-1.7 мкМ, в то время как у пациентов с сепсисом уровень 4-ГФМК

многократно превышает эти значения, до 5-10 мкМ и выше, в отдельных случаях достигая 100 мкМ [20, 21].

Современные экспресс-методы на основе сенсорных систем способны существенно уменьшить временные затраты при определении аналита [22-26]. Преимущества этих методов заключаются также в отсутствии необходимости систематического отбора проб на анализ благодаря использованию датчиков для определения концентрации веществ непрерывно и непосредственно в точке отбора проб. Также известно, что для повышения селективности сенсорных систем их поверхность можно модифицировать различными материалами, в частности, полимерами с молекулярными отпечатками [26-30]. Цель работы: разработка экспрессного способа определения 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты в модельных водных растворах модифицированными амперометрическими сенсорами.

Экспериментальная часть

В работе использована 4-ГФМК в качестве перспективного биомаркера сепсиса. Полное химическое название искомого маркера сепсиса – 3-(4-гидроксифенил)молочная кислота или 2-гидрокси-3-(4-гидроксифенил)пропановая кислота. Она представляет собой 2-гидроксикарбоновую кислоту, в которой один из метильных атомов водорода замещен 4-гидроксифенильной группой, с молярной массой 182.17 (рис. 1).

Для исходных растворов аналита использовали стандарт 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты (Sigma-Aldrich), по навеске, взятой на аналитических весах, а затем методом последовательного

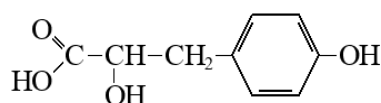


Рис. 1. Структурная формула 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты.
Fig. 1. Structural formula of 3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid

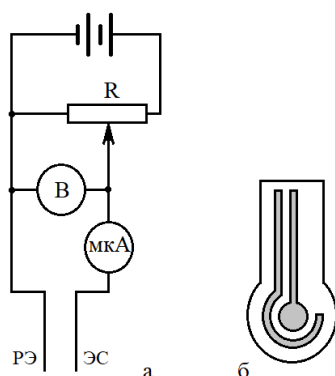


Рис. 2. Схема амперометрической установки (а) и планарный сенсор РЭ – рабочий электрод, ЭС – электрод сравнения

Fig. 2. Layout of the amperometric unit (a) and planar sensor, WE: working electrode, RE: reference electrode

разбавления серии растворов в диапазоне концентраций 0.2-0.0002 г/дм³.

Для определения 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты в модельных растворах использовали двух электродную амперометрическую установку (рис. 2). Источником питания служил прибор QJ1803С с интегрированными в него вольтметром, амперметром и потенциометром для регулировки напряжения в цепи.

Для изготовления планарных сенсоров, в качестве подложки выбрана полиимидная пленка, покрытая медной фольгой. Выбор данной пленки обусловлен химической стойкостью, устойчивостью к разрыву, а также широким рабочим диапазоном температур. После очистки и обезжиривания медного слоя, на него с помощью термотрансфера перенесли трафарет сенсора и провели химическое травление полученной заготовки. После чего сенсоры промыли дистиллированной водой и осушили фильтровальной бумагой. Полученные планарные сенсоры имели размеры сенсоров 5x7 мм.

Модифицирование электродов планарных сенсоров проводили полимером с молекулярными отпечатками 4-ГФМК. Для этого готовили полимеризационную смесь на основе сополимера 1,2,4,5-бензолтетракарбоновой кислоты с 4,4'-диаминодифенилоксидом в N,N-диметил-

формамиде (ОАО МИПП НПО «Пластик», Москва) и стандарта 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты (4-hydroxyphenyllactic acid), Sigma-Aldrich). Синтез проводили по стандартной методике, описанной ранее [31, 32], в две стадии (I – стадия при температуре 80°C, II – стадия при 180°C) методом нековалентного импринтинга [33-38].

Обсуждение результатов

Разработка экспресс-способов определения 4-ГФМК в крови пациентов состоит из нескольких этапов. На первом этапе представлялось целесообразным создать сенсоры на основе полимеров с молекулярными отпечатками и отработать методику определения 4-ГФМК в модельных водных растворах.

Для решения этой задачи планарные сенсоры модифицировали полимером с отпечатками 4-гидроксифенилмолочной кислоты (ПМО 4-ГФМК) и неимпринтированным полимером (полимером сравнения, ПС). Определение 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты в модельных растворах проводили методом градуировочного графика. Для ПМО-сенсора наблюдается линейная и убывающая зависимость силы тока от концентрации 4-ГФМК (рис. 3).

Установленные метрологические характеристики амперометрического сенсора на основе полимера с молекулярным

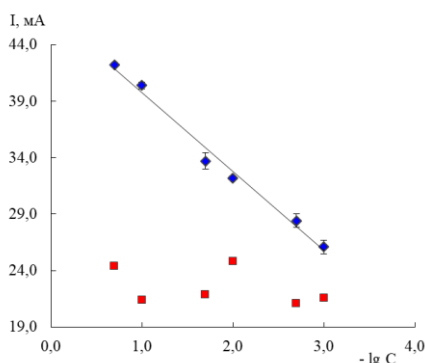


Рис. 3. Зависимость силы тока от $-\lg C$ 4-ГФМК в водном растворе: 1 – для сенсора на основе ПМО-4-ГФМК; 2 – для сенсора на основе ПС

Fig. 3. Dependence of current strength on $-\lg C$ HPLA in an aqueous solution, 1 – for the sensor based on HPLA MIP, 2 – for the sensor based on reference polymer

Таблица 1. Метрологические характеристики сенсора на основе на основе ПМО-4-ГФМК)
 Table 1. Metrological characteristics of the sensor based on HPLA MIP

Сенсор	Аналит	Диапазон определяемых концентраций, г/дм ³	C_{\min} , г/дм ³	S_r , %
ПМО-4-ГФМК	3-(4-гидроксибензил) молочной кислоты	$0.2-1 \cdot 10^{-3}$	$4.5 \cdot 10^{-4}$	1.9

Таблица 2. Определение 4-ГФМК в модельных растворах с помощью амперометрического сенсора методом «введено – найдено», (n=5; P=0.95)

Table 2. Detection of HPLA in model solutions by an amperometric sensor using the “introduced-found” method, (n=5; P=0.95)

Сенсор	Аналит	Введено С, г/дм ³	Найдено С, г/дм ³	S_r , %
ПМО-4-ГФМК	3-(4-гидроксибензил) молочная кислота	0.20	0.22 ± 0.04	3.0
		0.10	0.12 ± 0.04	5.7
		0.02	0.021 ± 0.009	7.5

Таблица 3. Определение 4-ГФМК в модельных растворах с помощью амперометрического сенсора методом добавок

Table 3. Detection of HPLA in model solutions using the amperometric sensor by the spike test

Сенсор	Аналит	Введено С, г/дм ³	Найдено С, г/дм ³	S_r , %
ПМО-4-ГФМК	3-(4-гидроксибензил) молочная кислота	0.2	0.196 ± 0.018	3.0
	молочная кислота	0.2	0.00004 ± 0.00003	13.8

отпечатком 3-(4-гидроксибензил)молочной кислоты представлены в таблице 1. Экспериментально установлен предел обнаружения 3-(4-гидроксибензил)молочной кислоты составил $4.5 \cdot 10^{-4}$ г/дм³. Правильность определения 4-ГФМК в

модельных растворах с помощью модифицированного амперометрического сенсора проверено методом «введено – найдено» (табл. 2).

Также было проведено определение 3-(4-гидроксибензил)молочной кислоты в

модельных растворах. Модельный раствор содержал анализируемую 3-(4-гидроксифенил)молочную кислоту ($C=0.2$ мг/дм³) и молочную кислоту ($C=0.2$ мг/дм³). Результаты определения представлены в таблице 3.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности ПМО-сенсора определять анализируемое вещество. Относительное стандартное отклонение проведенного сравнения концентраций кислоты приготовленных модельных растворов и установленных с помощью сенсора на основе ПМО-4-ГФМК не превышает 10%.

Заключение

Методом нековалентного импринтинга получили амперометрические сенсоры с молекулярными отпечатками 3-(4-

гидроксифенил)молочной кислоты. Определены метрологические характеристики полученных сенсоров. Определен диапазон определяемых концентраций, который составил 0.2-0.001 г/дм³.

Амперометрические сенсоры на основе полимеров с молекулярными отпечатками позволяют распознавать молекулы 3-(4-гидроксифенил)молочной кислоты в жидких средах. В перспективе данные сенсоры могут использоваться для анализа биологических систем и определения в них 4-ГФМК.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Bone R.C., Charles J., Fisher J.R., Clemmer, T.P., Slotman, G.J., Metz, C.A., Balk, R.A. Sepsis Syndrome: A Valid Clinical Entity. *Critical Care Medicine*. 1989; 17(5): 389-393.
2. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M.H., Sibbald W.J., and Members of the ACCP/SCCM Consensus Conference. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*. 1992; 101: 1644-1655.
3. Kempker JA, Martin GS. The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. *Clin Chest Med*. 2016; 37(2): 165-79.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.01.002>
4. Abraham E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but with Much Still to Be Done. *JAMA*. 2016; 315(8): 757-759.
5. Calvert J.S., Price D.A., Chettipally U.K., Barton C.W., Feldman M.D., Hoffman J.L., Jay M., Das R. A computational approach to early sepsis detection. *Computers in biology and medicine*. 2016; 74: 69-73.

6. Singer M. Deutschman C.S., Seymour C.W. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8): 801-810.
7. Ahmedov R.F., Karabaev H.K., Tagaev K.R. Nash opyt lecheniya ozhogovogo sepsisa. *Zhurnal Neotlozhnaya hirurgiya im. I.I. Dzhanelidze*. 2021; 1:10-11. (In Russ.)
8. Whicher J., Bienvenu J., Monneret G. Procalcitonin as an acute phase marker. *Ann Clin Biochem*. 2001; 8(5): 483-93.
<https://doi.org/10.1177/000456320103800505>
9. Romasheva M.L., Proshin D.G. Diagnostika sepsisa u bol'nyh v kriticheskikh sostoyaniyah. *Obshchaya reanimatologiya*. 2007; 4: 34-36. (In Russ.)
10. Kataeva A.V., Bahtina ZH.A. Sokrashchenie priznakovogo prostranstva v diagnostiki sepsisa. *ITNOU: Informatcionnye tekhnologii v nauke, obrazovanii i upravlenii*. 2018; 5(9): 30-33. (In Russ.)
11. Kozlov V.K. Sepsis, tyazhelyj sepsis, septicheskiy shok: patogeneticheskoe obosnovanie diagnoza, klinicheskaya interpretaciya, principy i metody diagnostiki. *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2014; 2(49): 20-40. (In Russ.)



12. Rudnov V.A., Kulabuhov V.V. SEPSIS-3: obnovlennye klyuchevye polozheniya, potencial'nye problemy i dal'nejshie prakticheskie shagi. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2016; 13(4): 4-11. <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2016-13-4-4-11>
13. Zhou Y., Yang Y., Pappas D. Microfluidic Chips for Sepsis Diagnosis. *Methods in Molecular Biology*. 2021; 2321: 207-219. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1488-4_18
14. Beloborodova N.V., Osipov A.A., Bedova A.YU. Biologicheskie svoystva nekotorykh nizkomolekulyarnykh aromatische-skih mikrobykh metabolitov, associirovannykh s sepsisom. *Antibiotiki i himioterapiya*. 2013; 7-8: 48-61. (In Russ.)
15. Moroz V.V., Beloborodova N.V., Osipov A.A., Vlasenko A.V., Bedova A.YU., Pautova A.K. Fenilkarbonovye kisloty v ocenke tyazhesti sostoyaniya i effektivnosti lecheniya bol'nykh v reanimatologii. *Obshchaya reanimatologiya*. 2016; 4: 37-48. (In Russ.)
16. Moroz V.V., Beloborodova N.V., Bedova A.Yu., Revel'skii A.I., Getsina M.L., Osipov A.A., Sarshor Yu.N., Buchinskaya A.A., Olenin A.Yu. Development of methods of the gas chromatographic determination of phenylcarboxylic acids in blood serum and their adaptation to clinical laboratory conditions. *Anal Chem*. 2015; 70: 495-501. <https://doi.org/10.1134/S1061934815040103>
17. Pautova A.K., Meglei A.Y., Chernevskaya E.A., Alexandrova I.A., Beloborodova N.V. 4-Hydroxyphenyllactic Acid in Cerebrospinal Fluid as a Possible Marker of Post-Neurosurgical Meningitis: Retrospective Study. *J. Pers. Med*. 2022; 12: 399. <https://doi.org/10.3390/jpm12030399>
18. Pautova A.K., Sobolev P.D. Patent RF, № 263571, 2017. (In Russ.)
19. Hughes A.T., Milan A.M., Shweihdi E., Gallagher J., Ranganath L. Method development and validation for analysis of phenylalanine, 4-hydroxyphenyllactic acid and 4-hydroxyphenylpyruvic acid in serum and urine. *JIMD Reports*. 2022; 63(4): 341-350. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12287>
20. Sobolev P.D., Burnakova N.A., Beloborodova N.V., Revelsky A.I., Pautova A.K. Analysis of 4-Hydroxyphenyllactic Acid and Other Diagnostically Important Metabolites of α -Amino Acids in Human Blood Serum Using a Validated and Sensitive Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method. *Metabolites*. 2023; 13: 1128. <https://doi.org/10.3390/metabo13111128>
21. Beloborodova N.V. Serum Aromatic Microbial Metabolites as Biological Markers in Intensive Care. In: Rajendram, R., Preedy, V.R., Patel, V.B. (eds) Biomarkers in Trauma, Injury and Critical Care. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications. Springer, Cham. 2023; 13: 245-268.
22. Mohamed A.H., Ahmed H., Mokhtar M., Sherin H., Mahmoud E., Dual fluorescence-colorimetric sensor based on silver nanoparticles for determination of tobramycin in its pharmaceutical preparations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023; 303: 123172.
23. Wenhao M., Wanyi X., Shaoxi F., Shixuan H., Bohua Y., Yongjia W., Changjun H., Danqun H., Deqiang W., Nanopore electrochemical sensors for emerging hazardous pollutants detection. *Electrochimica Acta*, 2024; 475: 143678.
24. Lin' K.N., Duvanova O.V., Nikitina S.Yu., Zyablov A.N. Primenenie p'ezosensirov dlya opredeleniya karbonovykh kislot v promezhutochnykh produktah proizvodstva pishchevogo etanola. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov*. 2019; 85(4): 11-16.
25. Duvanova O.V., Krivonosova I.A., Zyablov A.N., Falaleev A.V., Selemenev V.F., Sokolova S.A. Primenenie p'ezoelektricheskikh sensorov dlya opredeleniya oleinovej i pal'mitinovej kislot v rastitel'nykh maslah. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov*. 2017; 83(2): 18-22. (In Russ.)

26. Aytaç G., Gamze K., Mahmut K., Savaş S., Rıdvan S., Preparation of MIP-based QCM nanosensor for detection of caffeic acid. *Talanta*, 2014; 119: 533-537.
27. Zhibrova Yu.A., Zyablov A.N., Shcheglova N.A., Krasnikova O.P., Selemenev V.F. Polimery s molekulyarnymi otpechatkami dlya p'ezokvarcevyh sensorov. Soobshchenie 1. Analiz lekarstvennyh preparatov, sodержashchih glicin. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2008; 8(4): 686-688. (In Russ.)
28. Zyablov A.N., Govoruhin S.I., Duvanova O.V., Selemenev V.F., Nguen A.T. Protochno-inzhekcionnoe opredelenie valina p'ezokvarcevyim sensorom, modifitsirovannym polimerom s molekulyarnymi otpechatkami. *Analitika i kontrol'*. 2014; 18(4): 438-441. (In Russ.)
29. Krivonosova I.A., Duvanova O.V., Zyablov A.N., Sokolova S.A., Dyakonova O.V. The determination of fatty acids in liquids using piezoelectric sensors based on molecular imprinting polymers. *Butlerov communications*. 2015; 42(6): 152-157.
30. Arian Y., Somayeh F., Nishat T., Mina H., Molecularly imprinted polymers (MIP) combined with Raman spectroscopy for selective detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). *Talanta*. 2024; 267: 125271.
31. Zyablov A. N., Duvanova O. V. i dr. Patent RF, № 137946, 2014. (In Russ.)
32. Zyablov A. N., Duvanova O. V. i dr. Patent RF, № 1138636, 2014. (In Russ.)
33. Merenkova A.A., Vu H.I., Grechkina M.V., Zyablov A.N. Morfologiya poverhnosti polimerov s molekulyarnymi otpechatkami na osnove poliimida. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2020; 20(6): 760-764. (In Russ.)
34. D'yakonova O.V., Zyablov A.N., Kotov V.V., Eliseeva T.V., Selemenev V.F., Frolova V.V. Issledovanie sostoyaniya poverhnosti membran na osnove poliimidokisloty. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2005; 5(4): 501-506. (In Russ.)
35. D'yakonova O.V., Sokolova S.A., Zyablov A.N., Zhibrova YU.A. Issledovanie sostoyaniya poverhnosti membrannyh materialov metodom skaniruyushchej zondovoj mikroskopii. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2008; 8(5): 863-868. (In Russ.)
36. Vu H.I., Kao N.L., Zyablov A.N. Analiz svojstv plenok molekulyarno-imprintirovannyh polimerov na osnove poliimida. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2021; 21(3): 360-368. (In Russ.)
37. Yahan Cui, Jie Ding, Yu Su, Lan Ding. Facile construction of magnetic hydrophilic molecularly imprinted polymers with enhanced selectivity based on dynamic non-covalent bonds for detecting tetracycline. *Chemical Engineering Journal*. 2023; 52(1): 139291.
38. Ruixia G., Yi H., Lili Z., Xihui C., Dechun L., Min Z., Yuhai T., Yuansuo Z. A facile method for protein imprinting on directly carboxyl-functionalized magnetic nanoparticles using non-covalent template immobilization strategy. *Chemical Engineering Journal*. 2016; 284: 139-148.

Информация об авторах / Information about the authors

А.О. Коровкина – студент кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Ву Хоанг Иен – аспирант кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж; преподаватель кафедры Менеджмента качества и безопасности пищевых продуктов, Пищевой Промышленный Университет Хошимина, Вьетнам

Н.В. Белобородова – д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, глав.науч.сотр,

A.O. Korovkina – student, department of analytical chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia, korovkina.ao@gmail.com

Vu Hoang Yen – postgraduate student, department of analytical chemistry, Voronezh State University, Voronezh; lecturer Department of Food Safety and Quality Management, Ho Chi Minh City University of Food Industry. e-mail: yenvh@hufi.edu.vn

N.V. Beloborodova – PhD, professor, honored worker of science of the RF, chief researcher, head of the lab in Federal Research and Clinical Center of



зав.лаб. ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

А.Ю. Выборный – студент кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Н. Зяблов – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Intensive Care and Rehabilitation, Moscow, Russia, nvbeloborodova@yandex.ru

A.Yu. Vybornyi – student, department of analytical chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia, antonvyb.job@gmail.com

A.N. Zyablov – Dr.Sci. (Chemistry), professor, department of analytical chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia, alex-n-z@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 26.05.2023; поступила после исправлений 10.01.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.
The article was submitted 26.05.2023; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544.5.068.7

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12141

Анализ синтетических красителей в сточных водах методом ВЭЖХ

**Игорь Артемьевич Платонов[✉], Ирина Михайловна Муханова,
Максим Юрьевич Лабаев, Алена Александровна Салтанова**

Самарский национально-исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара,
Россия, pia@ssau.ru[✉]

Аннотация. Анализ синтетических красителей в сточных водах является актуальной задачей современной аналитической химии, поскольку повышенное содержание красителей в сточных водах может негативно сказаться на экологии. Для контроля за содержанием красителей в различных объектах часто применяется обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ), которая позволяет достоверно определить содержание интересующих веществ. Целью данной работы являлось создание и оценка метрологических характеристик методики анализа синтетических красителей в сточных водах предприятий с повышенным содержанием неорганических солей. Хроматографическая система, используемая в данной работе, состояла из насоса высокого давления производства Кнауер, разделение осуществлялось на обращено-фазовой колонке Kromasil 100-5-C18(w) (4.6×250 мм) в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы применяли ацетонитрил и раствор ацетата аммония. Детектирование синтетических красителей производилось на диодно-матричном детекторе Азуга. В работе представлены результаты концентрирования 10 синтетических красителей на коммерчески доступных патронах для твердофазной экстракции, которые подходят для работы с водными растворами с повышенным содержанием неорганических солей. Для каждого вещества была рассчитана степень концентрирования из дистиллированной и модельной сточной вод, которая варьируется от 2 до 98%. Наивысшую степень концентрирования из анализируемых патронов при эксплуатации в условиях близким к реальным сточным водам показал патрон марки «Диапак П», при рН концентрируемого раствора равного 4. По результатам данной работы разработана и валидирована методика одновременного определения 10 синтетических пищевых красителей (СПК) (E102, E104, E110, E122, E124, E129, E131, E133, E142, E151) в водных и органических растворах. Результаты работы могут быть полезны в области аналитического контроля за содержанием синтетических красителей в сточных водах предприятий. Предел промежуточной прецизионности методики не превысил 5%, а расширенная неопределенность измерения составила менее 10%.

Ключевые слова: обращено-фазовая ВЭЖХ, синтетические пищевые красители, диодно-матричное детектирование, твердофазная экстракция.

Для цитирования: Платонов И.А., Муханова И.М., Лабаев М.Ю., Салтанова А.А. Анализ синтетических красителей в сточных водах методом ВЭЖХ // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 236-245. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12141>

Original article

HPLC analysis of synthetic dyes in wastewater

Igor A. Platonov[✉], Irina M. Mukhanova, Maxim Yu. Labaev, [✉], Alyona A. Saltanova
Korolev Samara National Research University, Samara, Russian Federation, pia@ssau.ru[✉]

Abstract. The analysis of synthetic dyes in wastewater is an urgent task of modern analytical chemistry since an increased content of dyes in wastewater can have an adverse effect on the environment. Reverse phase high performance liquid chromatography (RP HPLC) is often used to control the content of dyes in various objects, which makes it possible to reliably determine the content of specified substances. The purpose of this work was to create and evaluate the metrological characteristics for the method of analysis of synthetic dyes in the



industrial wastewater with a high content of inorganic salts. The chromatographic system used in this work was a Knauer high-pressure pump. The separation was performed on a Kromasil 100-5-C18 (w) reverse phase column (4.6 × 250 mm) in the gradient elution mode. Acetonitrile and ammonium acetate solution were used as the mobile phase. Synthetic dyes were detected on an Azura diode array detector. The paper presents the results of concentrating 10 synthetic dyes on commercially available solid phase extraction cartridges that were suitable for working with aqueous solutions with a high content of inorganic salts. For each substance, the degree of concentration from distilled and model wastewater was calculated, which varied from 2 to 98%. Among the analysed cartridges, the highest degree of concentration during operation in conditions close to real wastewater was shown by the Diapak P cartridge, at a pH of the concentrated solution equal to 4. The results of this study were used to develop and validate a method for a simultaneous detection of 10 synthetic food dyes (SFD) (E102, E104, E110, E122, E124, E129, E131, E133, E142, E151) in aqueous and organic solutions. The results of the study can be used to provide analytical control of the content of synthetic dyes in the industrial wastewater. The limit of intermediate precision of the method did not exceed 5%, and the expanded uncertainty of the measurements was less than 10%.

Keywords: reverse phase HPLC, synthetic food dyes, diode-array detection, solid-phase extraction.

For citation: Platonov I.A., Mukhanova I.M., Labaev M.Yu., Saltanova A.A. HPLC analysis of synthetic dyes in wastewater. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 236-245. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12141>

Введение

Загрязнение сточных вод отходами производств является актуальной проблемой экологического контроля. Антропогенные факторы оказывают сильное негативное влияние на окружающую среду. Воздух, вода, земля, живые организмы, растения, животные и т. д. страдают от промышленных загрязнений. Сточные воды, попадая в водотоки, представляют опасность в первую очередь для биоценозов водоохраных зон и человека. Одним из основных органических загрязнителей воды являются различные красители, источниками которых являются предприятия по изготовлению красящих веществ, текстильные красильные производства, пищевая промышленность [1, 2]. При этом 10-15% красителей, используемых при крашении, попадают в окружающую среду в виде отходов [1]. Поскольку текстильные сточные воды являются токсичными, мутагенными и канцерогенными из-за присутствия красителей они нежелательны для любого использования. Ряд работ посвящен различным способам очистки сточных вод от красителей [3-8].

В связи с вышесказанным встает вопрос контроля содержания красителей в сточных водах, с помощью различных физико-химических методов анализа.

Современными широко распространенными методами определения синтетических красителей являются хроматографические методы: обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ), ион-парная ВЭЖХ, ультравысокоэффективная жидкостная хроматография (УВ ВЭЖХ) [9, 15].

В большинстве случаев для определения красителей наиболее рациональным является применение обращено-фазовой ВЭЖХ. К преимуществам данного метода можно отнести использование растворителей (ацетонитрил, метанол, вода) позволяющих работать в широком УФ-диапазоне, это дает возможность применять высокочувствительный УФ-спектрофотометр, который имеет низкий предел обнаружения по отношению к широкому ассортименту органических соединений [9], а в случае с красителями может выступать практически как селективный детектор, если проводить идентификацию красителей в видимом диапазоне электромагнитного излучения.

Как правило, для определения синтетических красителей применяют методики, основанные на использовании дорогостоящего ион-парного реагента [10-14], который может адсорбироваться на неподвижной фазе хроматографической колонки, что может негативно сказаться на её эксплуатационных характеристиках [15].

Однако существуют методики, лишенные этого недостатка с применением фосфатного или ацетатного буфера [16]. Для детектирования чаще всего используют спектрофотометрические детекторы ультрафиолетовой-видимой области, диодно-матричные (DAD), фотодиодные детекторы (PDA) [15].

В работе [17] описывают применение обращено-фазовой ВЭЖХ для одновременного определения 17 синтетических пищевых красителей в различных группах пищевой продукции. Анализ проводили на применении колонки C18 (Zorbax XDB, 150 x 4.6 мм, 5.0 мкм) в режиме градиентного элюирования. Использовали подвижную фазу состава: А – 1.5% раствор ацетата аммония, В – метанол: ацетонитрил (80:20).

Для определения синтетического пищевого красителя E110 в безалкогольном напитке в работе [18] разработали и применили метод, основанный на применении высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофотометрического метода. Хроматографическое определение E110 осуществлялось на колонке из нержавеющей стали размером 0.25 м x 4.6 мм, заполненной октадецилсилильным силикагелем для хроматографии типа Zorbax Eclipse XDB-C18 с размером частиц 5 мкм. Применяли подвижную фазу: ацетонитрил: вода: фосфорная кислота (80:20:0.4).

Авторы работы [19] проводят одновременное определение 8 красителей в конфетах и напитках с помощью обращено-фазовой хроматографии с градиентным элюированием. Подвижная фаза состоит из растворителя А (ацетат аммония 0.1M) и растворителя В (смесь метанола и ацетонитрила). Определение концентраций красителей проводят с помощью УФ-детектора.

Определению семи красителей в вине, в том числе E102, E133 посвящена работа [20]. В качестве растворителей А и В используют ацетат аммония и метанол соответственно. Для количественной

оценки содержания красителей в образцах также применяют УФ-детектор. Также для определения содержания красителей в смеси может применяться диодно-матричный [21] и масс-спектрометрический детекторы [22].

Резюмируя вышесказанное можно сделать заключение, что на сегодняшний день достаточно сложно найти методику пробоподготовки и анализа сточных вод с повышенной минерализацией на содержание синтетических красителей методом ВЭЖХ, хотя данный метод широко применяется для других объектов анализа. Целью данной работы являлась разработка методики анализа синтетических красителей в сточных водах предприятий с повышенным содержанием неорганических солей методами обращено-фазовой ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием.

Экспериментальная часть

Реактивы, материалы, оборудование.

В качестве объектов исследования были использованы синтетические пищевые красители: тартразин (E102), хинолиновый желтый (E104), желтый «солнечный закат» (E110), кармуазин (E122), понсо 4R (E124), очаровательный красный (E129), патентованный голубой (E131), бриллиантовый голубой (E133), зеленый (E142), черный блестящий (E151) (все вышеупомянутые красители приобретены у ООО «Динамик»). Для приготовления подвижных фаз использовали деионизированную воду марки В по ОСТ 11 029.003-80, ацетонитрил марки ЧДА и навеску соли ацетата аммония марки ЧДА.

Хроматографическое разделение СПК осуществлялось с помощью жидкостного хроматографа Azura с диодно-матричным детектором. на обращено-фазовой колонке Kromasil 100-5-C18(w) (4.6 × 250 мм) в режиме градиентного элюирования.

В качестве подвижной фазы использовались следующие растворы: Линия А –

буферный раствор (раствор аммония уксуснокислого концентрацией 0.1 моль/дм³: ацетонитрил = 90:10%), линия В – раствор ацетонитрила (ацетонитрил : вода = 90:10%).

В буферный раствор на этапе приготовления добавляется 10% органической составляющей во избежание образования пузырьков воздуха в момент смешения воды и ацетонитрила в хроматографической системе. Аналогично 10% воды добавляется в ацетонитрил (линию В).

В результате многочисленных экспериментов по оптимизации разделения были подобраны оптимальные условия градиентного элюирования [9]. Особенностью данной методики является промывка и кондиционирование колонки в конце каждого анализа. В данном случае это происходит относительно быстро за счёт того, что неподвижная фаза С18 на основе силикагеля быстро приходит в адсорбционное равновесие, что позволяет удалять неидентифицируемые примеси веществ после каждого анализа. Это полезно при анализе реальных объектов, которые будут содержать синтетические красители.

Хроматографический анализ проводили на хроматографе AZURA с диодно-матричным детектором. В результате анализа каждого из аналитов были получены спектры красителей, а также определены максимумы поглощения для каждого из используемых веществ.

Градуировка. Для градуировки хроматографа использовали растворы красителей в деионизированной воде концентрациями 1, 3, 5, 8, 10 мг/дм³. Для оценки степени концентрирования готовили раствор концентрацией 0.01 мг/дм³. Хроматограмма данного раствора была аналогична хроматограмме чистой деионизированной воды.

Концентрирование красителей из сточной воды на патронах для твердофазной экстракции. Для удаления взвешенных частиц образец сточной воды фильтровался через бумажный фильтр «синяя

лента». Далее проводилась твердофазная экстракция на концентрирующем патроне.

В диссертации [23] описана методика концентрирования синтетических красителей с помощью патронов типа Диапак А, содержащих оксид алюминия в качестве сорбента. Аналогичная методика описана в ГОСТ [24]. Однако, так как в нашем случае матричный раствор сточной воды может содержать большое количество щелочей, органических и неорганических солей, кислот и тяжелых металлов [25], полярные сорбенты не подойдут для анализа сточной воды. Для исследования сорбции красителей на патроне для твердофазной экстракции были выбраны 2 типа патронов: 1) Диапак П и 2) Диапак С16М.

Работа с концентрирующими патронами происходит в 4 этапа: кондиционирование, сорбция, промывка и элюирование.

После этапа кондиционирования проводили сорбцию на патронах. 500 см³ стандартного раствора концентрацией 0.01 мг/дм³ пропускали через патрон. Далее промывали патрон деионизированной водой, смывы отбрасывали. Далее проводили элюирование синтетических красителей ацетоном и упаривание полученного раствора. Красители являются термически устойчивыми, что позволяет упаривать их растворы в жестких условиях.

После упаривания сухой остаток растворялся в растворе А. Полученный раствор дозировали при помощи крана-дозатора жидкостного хроматографа. Первым этапом исследования процесса пробоподготовки было исследование влияния рН водной матрицы на сорбцию красителей. Для этого проводили концентрирование стандартных растворов красителей при 3 вариантах рН: 3.0; 4.0; 6.0.

После выбора оптимального рН раствора для каждого концентрирующего патрона проводилась твердофазная экстракция красителей из модельной смеси

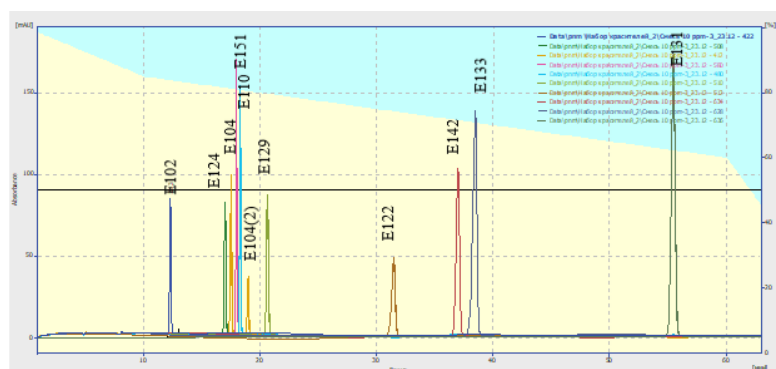


Рис. 1. Хроматограмма раствора пищевых красителей концентрацией 10 мг/дм³
 Fig. 1. Chromatogram of a solution of food dyes with a concentration of 10 mg/l

Таблица 1. Максимумы поглощения и времена удерживания СК
 Table 1. Maximum absorption and retention times of SFs.

№	Е номер красителя	Максимум поглощения, нм	Время уд. [мин]
1	E102	422	12.3
2	E124	508	17.0
3	E104	412	17.5
4	E151	580	18.0
5	E110	480	18.3
3(2)	E104 (2)	412	19.0
6	E129	510	20.6
7	E122	512	31.6
8	E142	634	37.1
9	E133	628	38.5
10	E131	636	55.5

сточной воды. Концентрация стандартного раствора и методика концентрирования была аналогичной.

Обсуждение результатов

Хроматограмма раствора СК концентрацией 10 мг/дм³ представлена на рисунке 1. Диодно-матричный детектор позволяет записывать сигнал при длинах волн от 190 до 700 нм. На хроматограмму выведены максимумы поглощения для всех красителей.

Время удерживания соответствующих пиков каждого из красителей приведены в таблице 1.

Для удобства восприятия на хроматограмме показаны пики красителей только при максимуме их поглощения. Мешающие для восприятия возмущения пиков красителей при близких к максимуму длин волн были удалены.

В данном хроматографическом разделении в отличие от методики [1], где также как и здесь, используется ацетатный буфер, не используется метанол, что, несомненно, является преимуществом, так как метанол в сочетании с водными растворами образует высоковязкие смеси, которые заметно повышают рабочее давление системы [9].

Пики E151 и E110 при концентрации раствора 10 мг/дм³ частично перекрываются при данном режиме, однако при максимуме светимости E151 не наблюдается пика красителя E110 и аналогично для красителя E110, при его максимуме поглощения не происходит детектирование красителя E151.

Результаты концентрирования стандартных растворов красителей концентрацией 0.01 мг/дм³. При концентрировании 500 см³ раствора концентрацией 0.01 мг/дм³ максимальная возможная

Таблица 2. Результаты анализа растворов 0.01 мг/дм³ после концентрирования при различных значениях рН

Table 2. Results of the analysis of 0.01 mg/dm³ solutions after concentrating at different pH values

Аналит	Концентрация, мг/дм ³ Диапак П рН=3.0	Концентрация, мг/дм ³ Диапак П рН=4.0	Концентрация, мг/дм ³ Диапак П рН=6.0	Концентрация, мг/дм ³ Диапак С16М рН=3,0	Концентрация, мг/дм ³ Диапак С16М рН=4.0	Концентрация, мг/дм ³ Диапак С16М рН=6.0
E102	1.9	1.9	0.1	0.4	0.1	0.1
E104	2.2	5.0	1.6	2.4	0.8	0.1
E124	0.4	3.4	0.0	0.7	0.1	0.1
E151	2.3	4.5	1.2	0.8	0.2	0.1
E110	2.0	4.9	1.3	1.0	0.3	0.0
E129	2.1	3.8	1.5	4.2	2.3	0.3
E122	1.6	3.7	1.4	3.8	3.4	0.8
E142	2.6	4.2	2.1	4.7	4.2	4.9
E133	0.9	3.9	1.4	4.1	4.1	4.6
E131	2.7	4.8	2.2	4.5	3.1	5.0

концентрация 5.0 мг/дм³, так как конечный сухой остаток растворяется в 1 см³ подвижной фазы. В таблице 2 представлены результаты сорбции синтетических красителей на концентрирующих патронах Диапак П и Диапак С16М при различных значениях рН.

Анализируя данные представленные в таблице 2, можно сделать вывод о том, что красители концентрируются не в полной мере. Для патрона Диапак П наилучшие показатели степени концентрирования для всех исследуемых красителей наблюдается при рН=4. Концентрирующий патрон Диапак С16М показал себя наилучшим образом при концентрировании более кислого раствора при рН=3. Однако для E102, 124, 151, 110 наблюдается очень низкие степени концентрирования, это, вероятнее всего, связано с тем, что гидрофильные молекулы данных красителей слабо удерживаются на неполярном сорбенте патрона С16М. Для красителей E122, E133, E131 степени концентрирования составили приблизительно столько же сколько для патрона Диапак П. А для красителей E129 и E142 даже больше чем на патроне Диапак П. В таблице 3 представлены степени концентрирования при различных рН растворов.

Эксперименты с модельной смесью сточной водой проводили для патрона Диапак П с рН пробы = 4, а для патрона Диапак С16 при рН=3.

Результаты концентрирования проб сточной воды с содержанием красителей 0.01 мг/дм³ представлены в таблице 4.

Сточная вода не подходит для концентрирования методом упаривания растворителя, так как при упаривании образуется большое количество минеральных солей, которые будет невозможно растворить в небольшом количестве подвижной фазы.

Как видно из данных, приведённых в таблице степень концентрирования для патрона Диапак П значительно ниже, чем для стандарта, приготовленного на дистиллированной воде. Однако, концентрирование практически всех красителей близко к 50%, это значит, что, взяв для концентрирования 500 см³ сточной воды и, в конечном итоге, перерастворив пробу в 1 см³ для проведения анализа, практически все красители сконцентрируются в 250 раз.

Степень концентрирования красителей из минерализованной воды на патроне Диапак С16М составила не более 22%, вероятно это связано с тем, что

Таблица 3. Степени концентрирования синтетических красителей на патронах Диапак П и С16М при различных значениях рН матрицы.

Table 3. Degrees of concentration of synthetic dyes on Diapak P and C16M cartridges at different pH values of the matrix

Аналит	Степень концентрирования, % Диапак П рН=3.0	Степень концентрирования, % Диапак П рН=4.0	Степень концентрирования, % Диапак П рН=6.0	Степень концентрирования, % Диапак С16 рН=3.0	Степень концентрирования, % Диапак С16 рН=4.0	Степень концентрирования, % Диапак С16 рН=6.0
E102	39	37	2	8	2	1
E104	45	99	32	47	16	2
E124	9	68	1	14	2	2
E110	40	98	26	20	6	1
E129	43	76	30	84	47	7
E122	32	74	28	76	69	16
E142	52	84	42	94	84	98
E133	17	78	29	81	82	93
E131	53	96	45	90	62	100

Таблица 4. результаты концентрирования синтетических красителей из сточной воды

Table 4. Results of concentrating synthetic dyes from wastewater

Аналит	Концентрация мг/дм ³ Диапак П, рН=4.0 сточная вода	Степень концентрирования, % Диапак П, рН=4.0 сточная вода	Концентрация мг/дм ³ С16М, рН=3.0 сточная вода	Степень концентрирования, % Диапак С16М, рН=3.0 сточная вода
E102	1.2	24	0,6	12
E104	2.8	56	1,1	22
E124	0.8	16	0,1	2
E110	2.7	54	0,7	15
E129	2.9	58	0,9	18
E122	2.8	57	0,6	11
E142	1.8	36	0,2	4
E133	1.7	33	0,8	16
E131	2.0	41	0,2	3

сточная вода имеет большую элюирующую силу по сравнению с водой с низким содержанием неорганических солей, это способствует быстрому смыву красителей, в следствии чего наблюдаются низкие степени концентрирования. Следовательно, патрон Диапак С16М не подходит для твердофазной экстракции синтетических красителей из сточной воды.

Валидация методики определения синтетических красителей. Данные, которые использовали для оценки прецизионности и расширенной неопределённости измерений были получены при анализе и

пробоподготовке стандартных растворов синтетических красителей в модельной смеси сточной воды. Рассматриваемый диапазон концентраций стандартных растворов от 0.005 до 0.05 мг/дм³. Было проведено по 9 определений (n=2) для каждого раствора, с двумя меняющимися факторами: время и оператор. Результаты приведены в таблице 5.

Предел повторяемости рассчитывали по формуле 1.

$$r = Q(P, n)\sigma_r \quad (1)$$

где $Q(P, n)$ – коэффициент, зависящий от числа n результатов единичного анализа,

Таблица 5. Относительные значения пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, расширенной неопределенности при уровне доверительности $P = 0.95$

Table 5. Relative values of repeatability and intermediate precision limits and expanded uncertainty at the confidence level $P = 0.95$

Аналит	Предел повторяемости r , %	Предел промежуточной прецизионности R , %	Расширенная неопределенность измерения U , %
E102	2.14	2.78	7.13
E104	1.89	2.46	6.23
E124	3.84	4.99	8.73
E110	2.04	2.65	6.91
E129	1.83	2.38	6.15
E122	1.92	2.50	6.38
E142	3.47	4.51	8.62
E133	3.21	4.17	8.36
E131	2.30	2.99	7.59

полученных в условиях повторяемости, и доверительной вероятности P (значения коэффициентов для принятой вероятности $P=0.95$ и $n=2$ равен 2.77, σ_r – СКО повторяемости, принимаемое как СКО результатов анализа параллельных проб.

Предел промежуточной прецизионности R рассчитывали по формуле 2.

$$R = Q(P, n)\sigma_{Rm} \quad (2)$$

где σ_{Rm} – показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО, который рассчитывали по формуле 3.

$$\sigma_{Rm} \approx kS_r \quad (3)$$

где S_r – выборочное СКО результатов анализа, k – коэффициент, который принимать значения от 1.2 до 2.0.

Расширенная неопределенность измерения U рассчитывали, как корень квадратный из сумм составляющих неопределенностей.

$$U = \sqrt{(u_a^2 + u_b^2)} \quad (4)$$

где u_a^2 – стандартная неопределенность пробоподготовки, u_b^2 – стандартная неопределенность хроматографического анализа. u_a , u_b рассчитываются как абсолютная погрешность измерения, деленная на $\sqrt{3}$.

Заключение

В результате проведенных исследований была разработана методика анализа 10 синтетических красителей в сточных

водах повышенной минерализации, содержащей органические гидрофобные примеси. Методика заключается в твердофазной экстракции красителей из сточной воды, с последующим определением концентраций красителей методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодноматричным детектированием. Наибольшая степень извлечения синтетических красителей из сточных вод достигается при использовании концентрирующих патронов Диапак П при рН концентрируемой пробы равной 4. Нижний предел измерения методики составляет 2-5 мкг/дм³ для синтетических красителей (за исключением E102 и E124) и 10 мкг/дм³ для E102 и E124. Данная методика применима для анализа сточных вод текстильно-красочной промышленности (пищевой промышленности). Максимальная расширенная неопределенность результата измерения составила 8.73 % на нижнем уровне диапазона измерения для наименее концентрируемого красителя E124. Данная методика может использоваться для аналитического контроля за содержанием красителей в сточных водах пищевых производств.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет из-



вестных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые

могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1 Ghaly A. E., Ananthashankar R., Alhattab M., Ramakrishnan V.V. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. *J Chem Eng Process Technol.* 2014; 5(1): 18.

2 Raman C.D., Kanmani S. Textile dye degradation using nano zero valent iron: A review. *Journal of Environmental Management.* 2016; 177(15): 341-355.

3 Akpan U.G., Hazard J. Parameters affecting the photocatalytic degradation of dyes using TiO₂-based photocatalysts: a review. *Journal of Hazardous Materials.* 2009; 170: 520-529.

4 Ali S.W., Mirza, M.L., Bhatti T.M. Removal of Cr (VI) using iron nanoparticles supported on porous cation-exchange resin. *Hydrometallurgy. Journal of Hydrometallurgy.* 2015; 157: 82-89.

5 Batool S., Akib S., Ahmad M., Balkhair K.S., Ashraf M.A. Study of modern nano enhanced techniques for removal of dyes and metals. *Journal of Nanomater.* 2014; 1-20.

6 Tratnyek P.G., Johnson R.L. Nanotechnologies for environmental cleanup. *Journal of Nano Today.* 2006; 1: 44-48.

7 Robinson T., McMullan G. Marchant R., Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Journal of Bioresour. Technol.* 2001; 77: 247-255.

8 Satapanajaru T., Chompuchan C., Suntorchot P., Pengthamkeerati P. Enhancing decolorization of reactive black 5 and reactive red 198 during nano zerovalent iron treatment. *Journal of Desalination.* 2011; 266: 218-230.

9 Styskin E.L., Icikson L.B., Braude E.V. Prakticheskaja vysokoeffektivnaja zhidkostnaja hromatografija. M. 1986. 284 p. (In Russ.)

10 GOST 33406-2015. Produkcija alkohol'naja, bezalkogol'naja i sokovaja, dobavki vkusoaromaticheskie. Opređenje soderžhanija sinteticheskikh krasitelej metodom vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii. Minsk: Gosstandart. 2017. P. 10. (In Russ.)

11 GOST 31504-2012. Moloko i molochnaja produkcija. Opređenje soderžhanija konservantov i krasitelej metodom VJeZhH. Minsk: Gosstandart. 2013. P. 18. (In Russ.)

12 MVI MN 2399-2005. Metodika opredelenija sinteticheskikh krasitelej v alkohol'nyh i bezalkogol'nyh napitkah s pomoshh'ju vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii. Cvid-vo ob attestacii № 380/2005 ot 07.12.2005. Minsk: GU «Resp. nauch.-prakt. centr gigieny». 2005. P. 11. (In Russ.)

13 Instrukcija po primeneniju Reg. № 108-1006, utv. 05.01.2007. Metodika opredelenija sinteticheskikh krasitelej v konditerskikh i hlebobulochnyh izdelijah, molochnyh produktah, sokah, biologicheskii aktivnyh i pishhevnyh dobavkah s pomoshh'ju VJeZhH. Minsk: Respublikanskij nauchno-prakticheskij centr gigieny. 2007. P.11. (In Russ.)

14 Kiseleva M.G., Pimenova V.V., Eller K I. Optimization of Conditions for the HPLC Determination of Synthetic Dyes in Food. *Journal of Analytical Chemistry.* 2003; 58(7): 685.

15 Sychev K. Prakticheskij kurs zhidkostnoj hromatografii. M., KOKORO. 2013. 272 p. (In Russ.)

16 GOST 34229-2017 Produkcija sokovaja. Opređenje sinteticheskikh krasitelej metodom vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii. Moskva: Standartform. 2018. P. 21. (In Russ.)

17 Poljanskih E.I., Belysheva L.L., Fedorova T.A., Filatchenkova E.V., Pleshak E.M. Metodika kontrolja soderžhanija sinteticheskikh krasitelej v pishhevoj produkcii.



Himicheskaja bezopasnost'. 2019; 3(1): 154-169. (In Russ.)

18 Malinka E.V., Egorova A.V., Anel'chik A.V., Antonovich V.P. Opredelenie sinteticheskogo pishhevogo krasitelja E110 v bezalkogol'nom napitke. *Himicheskaja nauka i tehnologija*. 2015; 1(30): 29-33. (In Russ.)

19 Mazdeh F.Z., Khorrami A.R., Moradi-Khatoonabadi Z., Aftabdari F.E., Shams Ardekani M.R., Moghaddam G., Hajimahmoodi M. Determination of 8 synthetic food dyes by solid phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Trop. J. Pharm. Res.* 2016; 15(1): 173-181.

20 Zhang Y., Zhou H., Wang Y., Wu X., Zhao Y. Simultaneous determination of seven synthetic colorants in wine by dispersive micro-solid-phase extraction coupled with reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 2015; 53: 210-218.

21 Pagáčiková D., Lehotay J. Determination of synthetic colors in meat products using high performance liquid chromatography with photodiode array detector. *J. Liq.*

Chromatogr. Related Technol. 2015; 38: 579-583.

22 Zou T., He P., Yasen A., Li Z. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with photodiode array and tandem mass detectors. *Food Chem.* 2013; 138: 1742-1748.

23 Ramazanov G.R. Diss. kand. him. nauk. M., 2016, 186 p. (In Russ.)

24 GOST – 32050-2013. Metody identifikacii i opredelenija massovoj doli sinteticheskikh krasitelej v karameli. Moskva: Standartinform. 2014. P. 27. (In Russ.)

25 Odincova O.I., Kozlova O.V., Kuvaeva E.Ju. Tekstil'no-vspomogatel'nye veshhestva v processah krashenija tekstil'nyh materialov: ucheb. Posobie. Ivan. Gos. himiko-tehnologicheskij universitet. Ivanovo, 2017. 160 p. (In Russ.)

26 Vasijarov G.G., Alekseeva G. S. Koncentrirujushhie patrony diapak. Moskva, 2018. 51 p. (In Russ.)

27 MI 2881-2004 Metodiki kolichestvennogo himicheskogo analiza. Procedury proverki priemlemosti rezul'tatov analiza. FGUP «UNIIM». 2004. 25 p. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

И.А. Платонов – д.т.н., профессор, заведующий кафедрой химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

И.М. Муханова – к.х.н., доцент кафедры химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

М.Ю. Лабаев – аспирант кафедры химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

А.А. Салтанова – студент кафедры химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, Самара, Россия

I.A. Platonov – prof., grand Ph.D (technical sciences), Head of the department of chemistry, Samara National Research University, Samara, Russian Federation, e-mail: pia@ssau.ru

I.M. Muhanova – candidate of Chemical Sciences. Associate Professor of the chemistry Department, Samara National Research University, Samara, Russian Federation, e-mail: mim042004@mail.ru

M.Y. Labaev – the postgraduate student of the Department of Chemistry, Samara National Research University, Samara, Russian Federation, e-mail: maxlabaev@gmail.com

A.A. Saltanova – student of the Department of Chemistry, Samara National Research University, Samara, Russian Federation, e-mail: saltanovaalena324@gmail.com

Статья поступила в редакцию 18.03.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 18.03.2024; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543:577.1:616.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12138

Хроматографический анализ аминокислотного состава желчных камней

**Екатерина Валерьевна Машина[✉],
Светлана Николаевна Шанина, Ольга Евгеньевна Амосова**

Институт геологии Федерального исследовательского центра

«Коми научный центр Уральского отделения РАН», Сыктывкар, Россия, mashina@geo.komisc.ru[✉]

Аннотация. Желчнокаменная болезнь (холелитиаз) – многофакторное заболевание, характеризующееся образованием желчных камней. Изучение состава желчных камней необходимо для установления механизма их образования и решения многих практических вопросов. На данный момент, неясно, какая белковая компонента участвует в формировании желчных камней и как она связана с их составляющими. В работе показана возможность качественного и количественного определения аминокислот в составе желчных камней мужчин и женщин разного возраста с использованием метода газовой хроматографии GC-17A (Shimadzu). Анализ аминокислотного состава желчных камней включает в себя кислотный гидролиз образцов с 6М HCl при 105°C в течение 12 часов, последующую очистку, получение производных выделенных аминокислот и их определение методом газовой хроматографии. Данная методика позволяет определять D- и L-формы аминокислот. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы Statistica 6.0. В результате проведенного исследования установлено, что желчные камни холестеринового состава, принадлежащие женщинам, возраст которых не превышал 50 лет, характеризуются самыми низкими содержаниями аминокислот. В аминокислотном составе холестеринового типа камней преобладают глицин и L-формы серина, аланина и глутаминовой кислоты. Холестериновые камни с минеральной компонентой характерны для пожилых женщин (старше 60 лет) и мужчин среднего возраста (от 37 лет), и имеют более высокие содержания аминокислот, чем холестериновые желчные камни. В данном типе камней преобладают глицин и L-формы лейцина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты. Самые высокие содержания аминокислот установлены в пигментных камнях, как у мужчин, так и у женщин старше 55 лет. В аминокислотном составе камней пигментного типа преобладают глицин и L-формы глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, лейцина, аланина. В желчных камнях холестеринового состава D-аминокислоты не обнаружены. В холестериновых камнях с минеральной компонентой и пигментных желчных камнях установлена D-аспарагиновая кислота. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод газовой хроматографии для изучения аминокислотного состава желчных камней.

Ключевые слова: аминокислотный анализ, кислотный гидролиз, газовая хроматография, аминокислоты, желчные камни.

Благодарности: работа выполнена в рамках темы НИР ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (ГР № 122040600009-2).

Для цитирования: Машина Е.В., Шанина С.Н., Амосова О.Е. Хроматографический анализ аминокислотного состава желчных камней // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 246-256. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12138>

Original article

Chromatographic analysis of the amino acid composition of gallstones

Ekaterina V. Mashina[✉], Svetlana N. Shanina, Olga E. Amosova

Institute of Geology of Federal Research Centre "Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences", Syktывkar, Russia, mashina@geo.komisc.ru[✉]



Abstract. Gallstone disease (cholelithiasis) is a multifactorial disease characterised by the formation of gallstones. Studying the composition of gallstones is necessary to understand the mechanism of their formation and to solve many practical issues. At present, it is not clear which protein component is involved in the formation of gallstones and how it is related to their components. The study showed the possibility of qualitative and quantitative determination of amino acids in the composition of gallstones of men and women of different ages using a GC-17A gas chromatograph (Shimadzu). Analysis of the amino acid composition of gallstones includes acid hydrolysis of samples with 6M HCl at 105°C for 12 hours, subsequent purification, obtaining derivatives of isolated amino acids, and their determination by gas chromatography. This technique enables the determination of D- and L-forms of amino acids. Statistical processing of the obtained data was carried out using Statistica 6.0. The study revealed that cholesterol gallstones belonging to women up to 50 years of age have the lowest amino acid content. The amino acid composition of cholesterol gallstones is dominated by glycine and L-forms of serine, alanine, and glutamic acid. Cholesterol gallstones with mineral content are typical for elderly women (over 60 years) and middle-aged men (from 37 years), and have higher amino acid content than cholesterol gallstones. Glycine and the L-forms of leucine, glutamic acid, and asparagic acid are prevalent in these types of gallstones. The highest amino acid content was recorded in pigment gallstones of both men and women over 55 years of age. The amino acid composition of pigment gallstones is dominated by glycine and L-forms of glutamic acid, asparagic acid, leucine, and alanine. In cholesterol gallstones, no D-amino acids were found. In cholesterol gallstones with mineral content and pigmented gallstones, D-aspartic acid was detected. The obtained results allow us to recommend the method of gas chromatography for studying the amino acid composition of gallstones.

Keywords: amino acid analysis, acid hydrolysis, gas chromatography, amino acids, gallstones.

Acknowledgements: the work was carried out within the framework of research project of the Institute of Geology of Federal Research Centre "Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences" No. 122040600009-2.

For citation: Mashina E.V., Shanina S.N., Amosova O.E. Chromatographic analysis of the amino acid composition of gallstones. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 246-256. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12138>

Введение

Желчнокаменная болезнь (холелитиаз) относится к дисметаболическому заболеванию, обусловленному образованием желчных камней в гепатобилиарной системе человека. Холелитиаз занимает одно из ведущих мест среди заболеваний органов пищеварения, необходимость его исследований очевидна, поскольку в мире постоянно увеличивается число пациентов, связанных с патогенным камнеобразованием в организме человека. Знание тонкостей патогенеза холелитиаза является ключом для разработки эффективных мер профилактики и осуществления успешного лечения данного заболевания. Выделяют холестериновый и пигментный холелитиаз. Данное разделение обусловлено основными камнеобразующими компонентами. В холестериновых камнях таким компонентом является холестерин, в пигментных камнях – билирубинат кальция. Холестериновый холелитиаз характерен в большей степени для

стран с западным стилем жизни и составляет до 80% случаев, тогда как пигментный – для стран востока [1, 2]. Желчнокаменная болезнь встречается значительно чаще у женщин, чем у мужчин [3, 4]. С возрастом частота образования желчных камней возрастает [5, 6]. В процессах формирования желчных камней помимо холестерина и билирубината кальция принимают участие и другие составляющие – минеральная компонента (фосфат кальция, карбонат кальция), белки, смеси различных металлов, в том числе железо, медь и другие. На сегодняшний день белковая компонента в патогенезе желчнокаменной болезни наименее изучена. В литературе есть лишь отдельные данные о муцинах, которые взаимодействуют с холестерином [7-10], а также о присутствии в желчи плазменных белков [11, 12]. Получить информацию о составе белковых веществ, принимающих участие в образовании желчных камней, может исследование их аминокислотного

состава. Большинство публикаций касаются аминокислот для патогенных образований посвящены мочекаменной болезни и их исследованию в моче [13 – 16]. Отмечается важность подобных исследований, так как они могут дать представления о роли белково-аминокислотного метаболизма в образовании камней. Анализ аминокислотного состава желчных камней посвящены единичные работы, с кратким описанием методики и исследованием их методом жидкостной хроматографии [17]. В связи с этим, основной целью данного исследования было изучение аминокислотного состава желчных камней методом газовой хроматографии в образцах разного состава с привязкой к пациентам (пол, возраст).

Экспериментальная часть

Исследования аминокислотного состава проведено для двадцати образцов желчных камней сформированных в желчном пузыре мужчин и женщин разного возраста. Среди них 16 образцов принадлежали женщинам и 4 образца – мужчинам. Пациенты были проинформированы о целях проведения исследований. Полная характеристика образцов с данными по фазовому составу, а также возрасту мужчин и женщин представлена в таблице 1. Для анализа аминокислотного состава использовали 100 мг навески тщательно растертых образцов желчных камней.

Анализ аминокислотного состава желчных камней включает в себя гидролиз образцов, последующую очистку, получение производных аминокислот, их разделение и идентификацию методом газовой хроматографии. За основу методики взяты методы определения энантиомеров аминокислот, изложенные в работах [18-21]. Все реагенты, используемые в работе, имеют высокую степень чистоты (осч), для приготовления растворов используется бидистиллированная и деионизированная вода.

Гидролиз. Для извлечения связанных аминокислот применялся кислотный гидролиз образцов в 6М HCl при температуре 105°C в течение 12 часов. Данные температура и время были выбраны исходя из рекомендаций по анализу энантиомеров аминокислот, чтобы исключить риск их рацемизации в ходе гидролиза [21].

Очистка образцов и выделение аминокислот. Полученные гидролизаты, кроме аминокислот, также содержат различные органические и неорганические соединения, поскольку исходные образцы характеризуются сложным фазовым составом. Исследования [21-25], показали, что для выделения аминокислот из подобных гидролизатов необходима их предварительная очистка, а наилучшие результаты получаются при применении для этих целей ионообменной смолы Dowex 50W X8. Она относится к группе сильнокислотных гелеобразных катионитов на основе сополимеров стирола-дивинилбензола. В нашей работе мы пользовались исключительно этими рекомендациями, своих исследований в данном направлении не проводилось.

Полученные гидролизаты отфильтровывали от остатков исходной пробы через мембранные стеклянные фильтры (GF6) в круглодонные колбы и добавляли внутренний стандарт (L-норвалин). Затем на роторном испарителе в вакууме отгоняли соляную кислоту при температуре 40°C, для того чтобы исключить возможность рацемизации аминокислот при высоких температурах. Полученные сухие остатки перерастворяли в 4 см³ 0.05М HCl и переносили в полипропиленовые колонки (25 см³), заполненные 3 г катионообменной смолы Dowex 50W X8 (фракция зерен 100-200 меш, общая пропускная способность 1.7 экв/дм³). В круглодонные колбы добавляли 4 мл 0.01М HCl и содержимое колб вновь переносили на колонки. Для удаления ионов металлов (Fe, Al и др.) и некоторых органических соединений (небольшие ароматические

Таблица 1. Характеристика образцов

Table 1. Characteristics of samples

№ образца	Фазовый состав	Возраст	Пол	ΣАК, мг/г
1	холестерин	35	ж	2.1
8	– // –	44	ж	1.9
5	– // –	46	ж	1.4
2	– // –	47	ж	1.0
3	– // –	49	ж	2.1
7	– // –	49	ж	1.2
4	– // –	50	ж	2.7
6	– // –	50	ж	3.4
13	холестерин, карбонат кальция	60	ж	8.3
16	холестерин, карбонат кальция	61	ж	4.4
12	холестерин, фосфат кальция	65	ж	7.8
9	холестерин, фосфат кальция	72	ж	5.6
11	холестерин, фосфат кальция	76	ж	7.2
15	холестерин, карбонат кальция	37	м	8.9
14	холестерин, карбонат кальция	38	м	4.8
10	холестерин, фосфат кальция	57	м	7.9
21	билирубинат кальция, карбонат кальция	55	ж	21.8
19	билирубинат кальция, фосфат кальция	60	ж	30.0
23	билирубинат кальция	67	ж	32.5
22	билирубинат кальция, карбонат кальция	58	м	30.1

Примечание: ж – женщина, м – мужчина, ΣАК – общее содержание аминокислот.

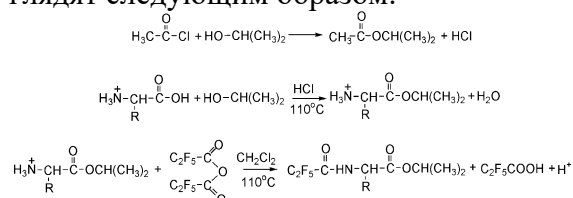
Notes: w – female, m – male, ΣАК – total amino acid content.

амины, аминсахара и др.) колонки промывали последовательно 5 раз по 5 см³ 0.1 М щавелевой кислоты (рН 1.6-1.8), 5 см³ 0.01М HCl и 5 см³ деионизированной воды. Затем в круглодонные колбы выделяли аминокислоты пропусканием через колонку 5 раз по 5 см³ 2.5М NH₄OH. Полученные растворы вновь отгонялись досуха на роторном испарителе и содержимое колб перерастворяли в 4 см³ 0.1М HCl. При наличии помутнения раствора или осадка содержимое переносили в микропробирки типа эппендорф и центрифугировали в течение 15 мин при

8000 об/мин. Затем жидкость декантировали в вials на 5 см³, выдерживали в течение 24 часов при -18°C и высушивали в замороженном состоянии.

Получение производных аминокислот.
 Для разделения оптических изомеров аминокислот методом газовой хроматографии широко применяются хиральные капиллярные колонки (например: CP-Chirasil Val, CP-Cyclodextrin-β-2,3,6-M-19, CP-Chirasil-DEX CB, CHIRALDEX G-TA). Для получения хорошо разделяемых пиков на подобных хиральных фазах аминокислоты необходимо перевести в их N(O)-трифторацетил (TFA)- или

N(O)-пентафторпропионил (PFP) изопрпиловые эфиры [18-20]. В нашей работе мы остановились на получении PFP-производных аминокислот, поскольку они являются более стабильными, по сравнению с TFA-производными [26, 27]. Уравнения реакций дериватизации выглядят следующим образом:



В высушенные образцы добавляли 800 мкл 4 М HCl в изопропанол, приготовленный смешиванием ацетилхлорида с изопрпиловым спиртом в соотношении 1:2.5 при 0°C. Вials плотно закрывали, нагревали при 110°C в течение 30 мин и охлаждали до комнатной температуры. Надосадочную жидкость переносили в вials на 1 см³ и остатки реагента удаляли под струей азота. Затем добавляли 260 мкл дихлорметана и 260 мкл пентафторпропионового ангидрида и вновь нагревали при 110°C в течении 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое вials вновь высушивали под азотом, а полученные производные N(O)-пентафторпропионил изопрпиловые эфиры аминокислот растворяли в 1 см³ дихлорметана и переносили в вials для хроматографии.

Газохроматографический анализ. Анализы полученных дериватов аминокислот выполнялись на газовом хроматографе GC-17A (Shimadzu) с пламенно-ионизационным детектором и автоматическим дозатором ввода проб. Для разделения аминокислот использовали капиллярную колонку CP-Chirasil L-Val, (длина 25 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина пленки 0.12 мкм, Varian Inc). Данная колонка содержит химически связанный с полисилоксанами L-валин-трет-бутиламид и была специально разработана для разделения энантиомеров аминокислот. Выбор условий анализа подбирался

экспериментально. В качестве газа-носителя использовали гелий. Скорость газа-носителя – 1 см³/мин. Ввод проб в колонку осуществлялся с делением потока (1:40). Температура испарителя составляла 250°C, пламенно-ионизационного детектора – 275°C. Анализ проводили при программировании температуры термостата колонок: 4 мин в изотермическом режиме при температуре 80°C, затем подъем температуры до 110°C со скоростью 4°C/мин, выдержка в течение 10 мин, подъем температуры до 160°C со скоростью 4°C/мин, подъем температуры до 190°C со скоростью 10°C/мин и изотермический режим в течение 7 мин. Обработка и запись хроматограмм осуществлялись программой GS Solution. Идентификация аминокислот на хроматограммах проводилась путем сравнения времени выхода пиков анализируемых соединений с временами удерживания эталонных аминокислот. Время удерживания – это время от момента ввода пробы в испаритель до момента, соответствующего максимальному значению сигнала для данного компонента на хроматограмме. Количественный анализ аминокислот проводится с использованием метода внутреннего стандарта [28]. Суть данного метода заключается в том, что к пробе с анализируемыми веществами добавляется известное количество стандарта. В качестве такого стандарта обычно подбирается такое вещество, которое отсутствует в анализируемой смеси и не реагирует с её компонентами. Основное достоинство метода внутреннего стандарта состоит в том, что он не требует воспроизводимого ввода пробы по величине. Количество стандарта подбирают так, чтобы площадь его пика была соизмерима с площадью пиков компонентов анализируемой смеси. Концентрация определяемого компонента (C_x) в анализируемом веществе рассчитывается по формуле:

$$C_x = (S_x \cdot m_{\text{ст}} / S_{\text{ст}} \cdot m_{\text{см}}) \cdot K_x,$$

где $S_{ст}$ – площадь пика стандарта, S_x – площадь пика анализируемого вещества, $m_{ст}$ – масса добавленного внутреннего стандарта, $m_{см}$ – масса пробы анализируемой смеси, K_x – калибровочный коэффициент.

Калибровочный коэффициент рассчитывается для каждого отдельного вещества путем приготовления ряда искусственных смесей исследуемого вещества со стандартом при их различных соотношениях. На основании полученных данных строятся графики в координатах $S_{ст}/S_x$ и $m_{ст}/m_x$ и рассчитывается угловой коэффициент K_x , представляющий собой калибровочную константу для данного анализируемого вещества.

Метод позволяет определять D и L формы для некоторых аминокислот (аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, фенилаланин, тирозин, лизин), глицина и ряда небιοгенных аминокислот (β -аланин, δ -аминовалериановая кислота, γ -аминомасляная кислота). Данная методика не позволяет определять аргинин, гистидин, цистин, поскольку для их анализа требуются индивидуальные условия дериватизации, а также триптофан и метионин, поскольку для них требуются другие условия гидролиза.

Аналитические исследования выполнялись в ЦКП «Геонаука» в ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Математическую обработку данных по содержаниям аминокислот осуществляли с использованием программы Statistica 6.0.

Обсуждение результатов

По данным анализируемой выборки содержания аминокислот в желчных камнях широко варьировали, что указывает на различное количество в них белковой компоненты (см. табл. 1, Σ АК). Во всех изученных желчных камнях аминокислоты в основном представлены L-формами (рис. 1). Для выявления групп желчных камней схожих по аминокислотному

составу был применен метод кластерного анализа [29]. Статистический анализ хроматографических данных показал, что исследуемые образцы разделились на три основных типа – холестериновый (Обр. 1-8), холестериновый с минеральной компонентой (фосфат кальция, карбонат кальция) (Обр. 10-16), пигментный (Обр. 19, 21-23). В аминокислотном составе холестеринового типа желчных камней доминируют глицин, серин, глутаминовая кислота и аланин (рис. 2, а). Данный тип желчных камней установлен только у женщин, возраст которых не превышал 50 лет. К холестериновым с минеральной компонентой отнесены образцы желчных камней, принадлежащих как женщинам, так и мужчинам. Причем в этой выборке оказались женщины старше 60 лет, а возраст мужчин варьировал от 37 до 57 лет. В аминокислотном составе желчных камней данного типа преобладают глицин, лейцин, глутаминовая кислота и аспарагиновая аминокислота (рис. 2, б). В пигментный тип желчных камней попали четыре образца, три из которых принадлежат женщинам и один – мужчине, возраст которых варьировал от 55 до 67 лет. В этом типе желчных камней доминируют глицин, глутаминовая кислота, лейцин, аспарагиновая кислота и аланин (рис. 2, в).

В желчных камнях холестеринового состава D-аминокислоты не обнаружены. При этом, в образцах холестериновых камней с минеральной компонентой и пигментных желчных камнях установлена D-аспарагиновая кислота. Для холестериновых желчных камней с минеральной компонентой её содержания меняются от 0.01 до 0.06 мг/г, показатель D/L-Asp составляет 0.04-0.09, а для пигментных камней от 0.20 до 0.35 мг/г, и 0.13-0.17 соответственно.

На основании проведенного хроматографического анализа аминокислот в образцах выявлены очень высокие содержания глицина в желчных камнях всех изученных типов. Это объясняется тем, что

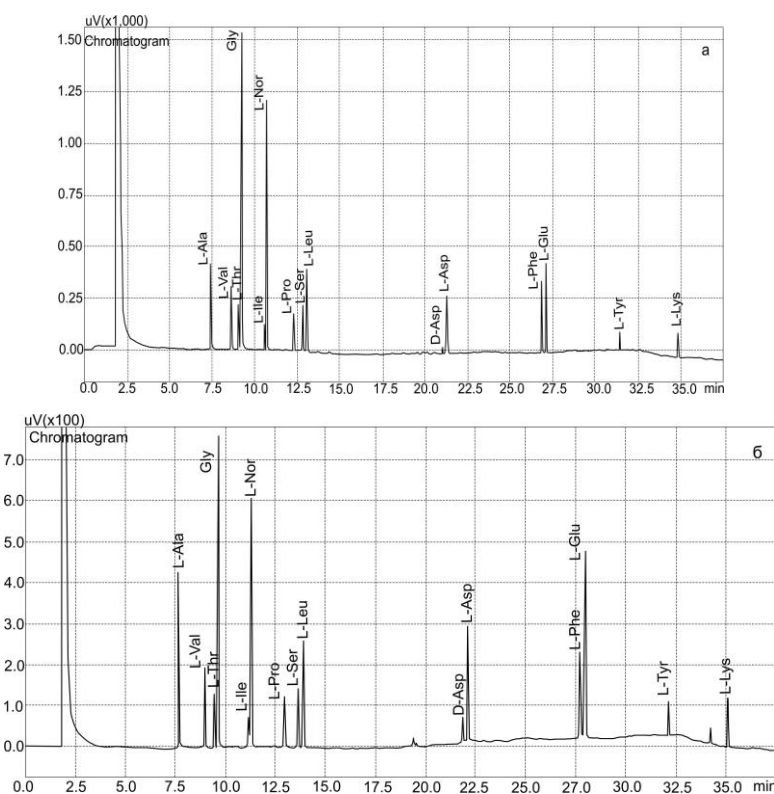


Рис. 1 Вид хроматограмм для образцов желчных камней 13 (а) и 21 (б). Буквенные обозначения: Ala – аланин, Val – валин, Gly – глицин, Пе – изолейцин, Ser – серин, Leu – лейцин, Pro – пролин, Asp – аспарагиновая кислота, Glu – глутаминовая кислота, Phe – фенилаланин, Tyr – тирозин, Lys – лизин, Nor – норвалин (внутренний стандарт).

Fig. 1. Chromatograms of gallstone samples 13 (a) and 21 (b). Designation: Ala – alanine, Val – valine, Gly – glycine, Пе – isoleucine, Ser – serine, Leu – leucine, Pro – proline, Asp – asparagic acid, Glu – glutamic acid, Phe – phenylalanine, Tyr – tyrosine, Lys – lysine, Nor – norvaline (internal standard)

глицин, в отличие от других аминокислот, входит не только в состав белковой компоненты, но и в состав глициноконъюгированных желчных кислот, которые, как известно, содержатся в желчи [11].

Установлено, что холестериновый тип желчных камней характеризуется наименьшими, а пигментный тип наибольшими содержаниями аминокислот. В пигментных желчных камнях, состоящих из билирубината кальция и кальциевой минеральной компоненты, увеличена доля кислых аминокислот, а также лейцина. Это может предполагать, что в их формировании принимали участие, например плазменные белки. Известно, что в альбумине, который является основным представителем белков крови, а также α -глобулинах преобладают лейцин

и гидрофильные аминокислоты – глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота оказывающие влияние на растворимость [30]. Установлено, что большинство белков плазмы крови могут связываться с кальциевой минеральной компонентой, например с карбонатом кальция [31]. Утверждается, что белки, богатые аспарагиновой и глутаминовой аминокислотами с большей вероятностью будут принимать участие в патогенезе мочевого камней состоящих из оксалата кальция, чем те, которые обладают лишь небольшим количеством таких остатков [14, 15]. Тем самым можно полагать, что аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты, имеющие как минимум две карбоксильные группы, в некоторых белках

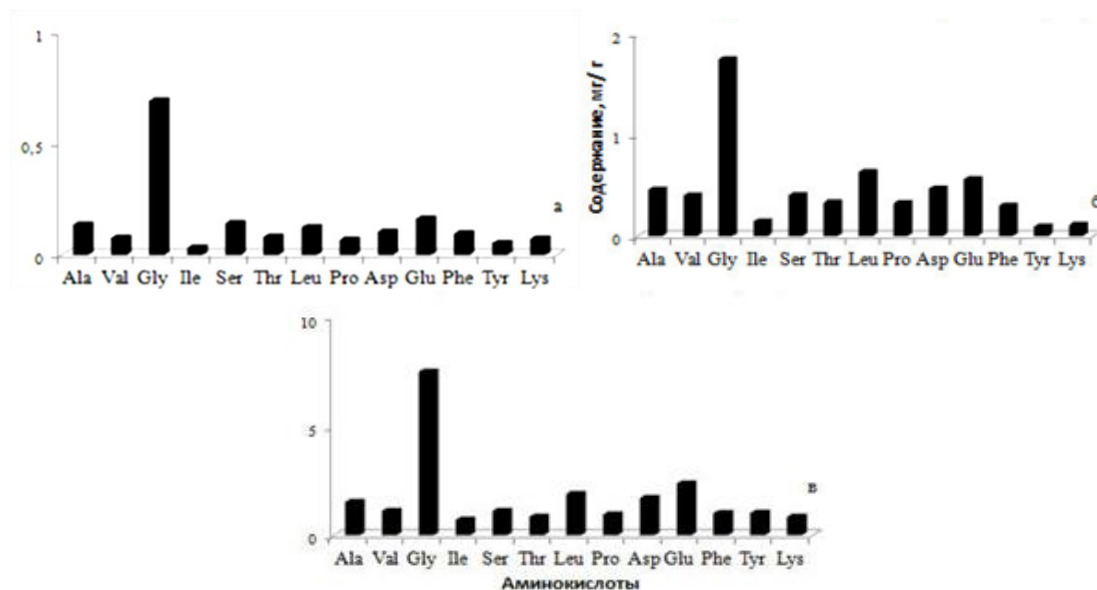


Рис 2. Медианные значения содержаний L-аминокислот в желчных камнях (мг/г): а – холестериновые (n = 8), б – холестериновые с минеральной компонентой (n = 8), в – пигментные (n = 4). Примечание. n – количество образцов.

Fig. 2. Median values of contents of L-amino acids in gallstones (mg/g). a – cholesterol type (n = 8), b – cholesterol with mineral component (n = 8), c – pigment type (n = 4). Note. n - amount of samples.

связываются с минеральной компонентой, в структуре которой, находится кальций.

Мы не исключаем присутствие в желчных камнях, более сложных белков гликопротеидов, содержащих олигосахаридные боковые цепи, присоединенные к аминокислотам. Кислотный гидролиз таких белков может не всегда приводить к переходу в гидролизат некоторых аминокислот. Согласно литературным данным [7 – 10], муцины могут взаимодействовать с холестерином. Возможно, что в холестериновых камнях содержатся подобные белки. Мы предполагаем, что причиной формирования камней холестеринового состава является пересыщение желчи холестерином. Связывание его с гликопротеидами происходит, вероятно, посредством дисперсионного взаимодействия [32].

В желчных камнях, часто обнаруживается различная микрофлора [33]. В связи с чем, источниками D-аспарагиновой кислоты в них могут являться микроорганизмы, которые, как известно, содержат

энантиомеры аминокислот [34]. Кроме того, появление D-форм может быть связано с рацемизацией белков в ходе патологических процессов [35]. В пигментных камнях содержание D-аминокислот выше, что может быть связано с наложением обоих факторов.

Заключение

Предложен способ определения некоторых аминокислот (D- и L-форм) в составе желчных камней. Анализ включает в себя кислотный гидролиз подготовленных образцов желчных камней с 6M HCl при 105°C в течение 12 часов, их последующую очистку, получение производных выделенных аминокислот и дальнейшее определение методом газовой хроматографии. Проведенные исследования позволили выявить некоторые особенности составов желчных камней. Желчные камни холестеринового состава, сформированные в организме женщин, не старше 50 лет характеризуются самыми низкими содержаниями аминокислот. В аминокислотном составе желчных камней данного

типа преобладают глицин и L-формы серина, аланина и глутаминовой кислоты. В холестериновых камнях с присутствием минеральной компоненты (карбонат кальция, фосфат кальция) содержания аминокислот выше. В их составе доминируют глицин и L-формы лейцина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты. Они сформированы в организме женщин старше 50 лет и мужчин среднего и зрелого возраста. В пигментных камнях установлены самые высокие содержания аминокислот, с преобладанием в составе глицина и L-форм глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, лейцина, аланина. Такие желчные камни выявлены у мужчин и женщин старше 55 лет.

В камнях холестеринового типа D-аминокислоты не обнаружены, тогда как в холестериновых камнях с минеральной компонентой и пигментных желчных камнях обнаружена D-аспарагиновая кислота. Присутствие D-форм может

быть связано с рацемизацией белков и микрофлорой. В пигментных камнях содержание D-аминокислот выше, что может быть связано с наложением обоих факторов.

Поскольку в желчных камнях могут содержаться сложные гликопротеиды, которые не до конца разрушаются при кислотном гидролизе, то полученные нами данные по содержанию некоторых аминокислот, возможно занижены. Полученные результаты носят предварительный характер, исследования аминокислотного состава желчных камней методом газовой хроматографии будут продолжены.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Shaffer E.A. Epidemiology and risk factors for gallstone disease: has the paradigm changed in the 21st century? *J. Curr. Gastroenterol Rep.* 2005; 7(2): 132-40.
2. Mendez-Sanchez N., Bahena-Aponte J., Chavez-Tapia N., Motola-Kuba D., Sanchez-Lara K., Ponciano-Radriguez G., Ramos M., Uribe M. Strong association between gallstones and cardiovascular disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2005; 100(4): 827-830.
3. Novacek G. Gender and gallstone disease. *Wien Med Wochenschr.* 2006; 156: 527-533.
4. Stinton L.M., Shaffer E.A. Epidemiology of Gallbladder Disease: gallstone disease and cancer. *Gut Liver.* 2012; 6(2): 172-187.
5. Bergman S., Sourial N., Vedel I., Hanna W.C., Fraser S.A., Newman D., Bilek A.J., Galatas C., Marek J.E., Monette J.

Gallstone disease in the elderly: are older patients managed differently? *Surg Endosc.* 2011; 25: 55-61.

6. Skvortsov V.V., Khalilova U.A. Diagnostika i lechenie zhelchnokamennoj bolezni. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya.* 2018; 157 (9): 142-150. (In Russ).

7. Berg A.A., Buul J.D., Ostrow J.D., Groen A.K. Measurement of cholesterol gallstone growth in vitro. *J. Lipid Res.* 2000; 41: 189-194.

8. Yoo K.S., Choi H.S., Jun D.W., Lee H.L., Lee O.Y., Yoon B.C., Lee K.G., Paik S.S., Kim Y.S., Lee J. MUC expression in gallbladder epithelial tissues in cholesterol-associated gallbladder disease. *Gut Liver.* 2016; 10(5): 851-858.

9. Lee S., Lamont J., Carey M. Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones. *Clin Invest.* 1981; 67: 1712-1723.

10. Dayan Y., Vilkin A., Niv Y. Gallbladder mucin plays a role in gallstone



- formation. *European Journal of Internal Medicine*. 2004; 15(7): 411-414.
11. Ichenko A.A. ZHelchekamennaya bolezni'. M.: Anaharasis. 2004; 200 p. (In Russ).
12. Reshetnyak V.I. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J. Gastroenterol*. 2013; 19(42): 7341-7360.
13. Primiano A., Persichilli S., Ferraro P. M., Calvani R., Biancolillo A., Marini F., Picca A., Marzetti E., Urbani A., Gervasoni J. A Specific Urinary Amino Acid Profile Characterizes People with Kidney Stones. *Disease Markers*. 2020; 1-7.
14. Kohri K., Takada M., Katoh Y., Kataoka Kurita T. Amino acids in urine and plasma of urolithiasis patients. *International Urology and Nephrology*. 1989; 21: 9-16.
15. Fleming D., Bronswijk W., Ryall R. A comparative study of the adsorption of amino acids on to calcium minerals found in renal calculi. *Clinical Science*. 2001; 101: 159-168.
16. Shaker Y.M., El-Hawary M.F., Zahran M.M., Mostafa S.O. Urine and Calculus Amino Acids in the Different Types of Urolithiasis. *Urol Int*. 1983; 38(1): 51-54.
17. Chen Y, Wang L.L., Xiao Y.X., Ni J.H., Yu Y. Analysis of amino acid constituents of gallstones. *World J Gastroenterol*. 1997; 3: 255-256.
18. Frank H. Chiral stationary phases for capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography Communications*. 1988; 11: 787-792.
19. Frank H., Rettenmeier A., Weicker F., Nicholzen G.J., Bayer E. Determination of enantiomer-labeled amino acids in small volumes of blood by gas chromatography. *Analytical Chemistry*. 1982; 54: 715-719.
20. Ketting D., Wadman S.K., Spaapen L.J.M., Van der Meer S.B., Duran M. Gas chromatography method for separation of amino acids enantiomers in plasma and urine. *Clinica Chimica Acta*. 1991; 204: 79-86.
21. Amelung W., Zhang X. Determination of amino acid enantiomers in soils. *Soil biology and biochemistry*. 2001; 33: 553-562.
22. Sowden F.J. Effect of hydrolysis time and iron and aluminum removal on the determination of amino compounds in soil. *Soil Science*. 1969; 107: 264-371.
23. Leenheer J.A., Huffman E.W.D. Analytical method for dissolved-organic carbon fractionation. *U.S. Geological Survey, Water-Resources Investigations*. 1979. 16 p.
24. Qualls R.G., Haines B.L. Geochemistry of dissolved organic nutrients in water percolating through a forest ecosystem. *J. Soil Sci. Soc. Am*. 1991; 55: 1112-1123.
25. Erbe T., Bruckner H. Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture. *Journal of Chromatography A*. 2000; 881: 81-91.
26. Abdalla S., Bayer E., Frank H., Derivatives for separation of amino acid enantiomers. *Chromatographia*. 1987; 23: 83-85.
27. Brueckner H., Schieber A. Determination of amino acid enantiomers in human urine and blood serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr*. 2001; 15: 166-172.
28. Vyahirev A.A., Shushunova A.F. Rukovodstvo po gazovoj hromatografii: Ucheb. posobie dlya him. i him.-tekhnolog. spec. vuzov. M., Vyssh. shk. 1987. 335 p. (In Russ).
29. Kim J.O., Mueller C.W., Klecka W.R., Oldenderfer M.S., Blashfield R.K. Faktornyj, diskriminantnyj i klasternyj analiz. M: Finansy i statistika. 1989. 215 p. (In Russ).
30. Cummings A.J., Flynn F.V. Amino-acid composition of serum proteins in health and disease. *J. Clin. Path*. 1955; 8: 153-159.
31. Burt H.M., Jackson J.K., Taylor D.R., Crowther R.S. Activation of human neutrophils by calcium carbonate polymorphs. *Digestive Diseases and Sciences*. 1997; 42(6): 1283-1289.
32. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Mironenko N.V., Butyrskaya E.V. *Lipidomika*.



Voronezh: Izdatel'sko-poligraficheskij centr «Nauchnaya kniga». 2023. 316 p. (In Russ).

33. Stewart L., Oesterle A. L., Erdan I., Griffiss J. M., Way L.W. Pathogenesis of pigment gallstones in Western societies: the central role of bacteria. *J. Gastrointest Surg.* 2002; 6(6): 891-903.

34. Cava F., Lam H., de Pedro M.A., Waldor M.K. Emerging knowledge of regulatory roles of d-amino acids in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68: 817-831.

35. Timme S., Collins M. Racemization of aspartic acid in human proteins. *J. Ageing Research Reviews.* 2002; 1(1): 43-59.

Информация об авторах / Information about the authors

Е.В. Машина – аспирант, научный сотрудник лаборатории экспериментальной минералогии ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

С.Н. Шанина – кандидат геолого-минералогических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной минералогии ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

О.Е. Амосова – кандидат геолого-минералогических наук, научный сотрудник лаборатории минерально-сырьевых ресурсов ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

E.V. Mashina – Ph. D. student of IG FRC Komi Scientific Center Ural Branch of RAS, researcher laboratory of Experimental mineralogy, Syktyvkar, Russian Federation

S.N. Shanina – Ph.D. in geology and mineralogy, senior researcher laboratory of Experimental mineralogy IG FRC Komi Scientific Center Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation

O.Ye. Amosova – Ph.D. in geology and mineralogy, researcher laboratory of Mineral resources IG FRC Komi Scientific Center Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 22.11.2023; одобрена после рецензирования 27.03.2024; принята к публикации 03.04.2024.

The article was submitted 22.11.2023; approved after reviewing 27.03.2024; accepted for publication 03.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 615.07:543.544: 519.876

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12128

Изучение стабильности биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с использованием электрофореза и масс-спектрометрии

Дарья Николаевна Луценко¹, Евгения Владимировна Компанцева^{1✉},
Алексей Сергеевич Чиряпкин¹, Екатерина Робертовна Гарсия¹,
Александр Александрович Озеров², Алексей Иванович Сливкин³,
Владимир Федорович Селеменев³, Хидмет Сафарович Шихалиев³,
Иван Панайотович Кодониди¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия, dskompanceva@mail.ru✉

²Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России, Волгоград, Россия

³Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. На базе центра инновационных отечественных лекарственных препаратов «Волгоградского государственного медицинского университета» сконструирован и синтезирован ряд пиримидиновых производных гуанидина для исследования их в качестве перспективных ингибиторов натрий-водородного обмена типа 1 (NHE-1), которые полезны для снижения поражения ткани при ишемии. Наиболее фармакологически ценным соединением оказался N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15). При создании нормативной документации для нового лекарственного средства одним из критериев качества является показатель «Родственные примеси», которыми могут быть технологические примеси и продукты деструкции действующего вещества. Целью исследования является изучение стабильности биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Определение предполагаемых продуктов деградации проводили методом стрессовых испытаний, используя методы капиллярного электрофореза и масс-спектропии. Изучение молекулы исследуемого VMA-13-15 и использование компьютерных технологий позволили спрогнозировать возможные процессы деструкции, среди которых наиболее вероятной может быть реакция гидролиза при термостатировании раствора исследуемого соединения в щелочной среде. In silico оптимизация геометрии рассматриваемых структур проводилась с использованием метода молекулярной механики MM+ в программе HyperChem 8.0.9. Итоговая пространственная оптимизация геометрии моделируемых молекул осуществлялась методом теории функционала плотности *ub3lyp* с базисным набором 6-311G**. Результирующий колебательный анализ термодинамических характеристик проводился в программе Orca, которая позволила получить значения энтальпий и энтропий для изучаемых соединений. Методом капиллярного электрофореза проведен анализ продуктов деградации водного раствора исследуемого вещества посредством «стресс-тестов», которыми изучалось влияние термического воздействия на VMA-13-15 в присутствии 0.1M раствора кислоты хлористоводородной и 0.1M раствора натрия гидроксида. Установлено, что наибольшее влияние на стабильность N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина оказывает щелочная среда, что и следовало из результатов вычислительного эксперимента. Изучен масс-спектр обнаруженного при термостатировании в щелочной среде продукта деградации. По совпадению молярной массы и времени выхода было подтверждено, что примесь на хроматограммах VMA-13-15 является незамещенным хиназолин-4(3H)-оном – исходным продуктом синтеза.

Ключевые слова: N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин, компьютерное моделирование, термодинамические расчеты, продукты деградации, капиллярный электрофорез, стресс-испытания, масс-спектропия.

Для цитирования: Луценко Д.Н., Компанцева Е.В., Чиряпкин А.С., Гарсия Е.Р., Озеров А.А., Сливкин А.И., Селеменев В.Ф., Шихалиев Х.С., Кодониди И.П. Изучение стабильности биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с использованием электрофореза



Original article

Study of the stability of the biologically active compound N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine using electrophoresis and mass spectrometry

Daria N. Lutsenko¹, Eugenia V. Kompantseva¹✉, Alexey S. Chiriapkin¹,
Ekaterina R. Garsiya¹, Alexander A. Ozerov², Alexey I. Slivkin³,
Vladimir F. Selemenev³, Khidmet S. Shikhaliev³, Ivan P. Kodonidi¹

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia, dskompanceva@mail.ru ✉

²Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

³Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Abstract. At the Scientific Centre of Innovative Medicines of Volgograd State Medical University, a number of pyrimidine derivatives of guanidine were designed and synthesised to study them as promising inhibitors of sodium-hydrogen exchanger isoform 1 (NHE-1), which can reduce tissue damage during ischemia. N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine (VMA-13-15) proved to be the most pharmacologically valuable compound. When preparing regulatory documentation for a new medicine, one of the quality criteria is the amount of related impurities. They can be technological impurities and degradation products of the active substance. The aim of the research was to study the stability of the biologically active compound N-[2-[4-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine. Anticipated degradation products were determined by stress testing, using capillary electrophoresis and mass spectroscopy. The study of the molecule of VMA-13-15 and the use of computer technologies allowed us to predict possible degradation processes. Among them, the most likely to occur is the hydrolysis reaction during thermostating of the solution of the studied compound in an alkaline medium. In silico optimisation of the geometry of the studied structures was carried out by the MM+ molecular mechanics method using HyperChem 8.0.9. The final spatial optimisation of the geometry of the modelled molecules was carried out by the density functional theory method ub3lyp with 6-311G** basis sets. The resulting vibrational analysis of thermodynamic characteristics was carried out in Orca, which allowed us to obtain enthalpy and entropy values for the studied compounds. By capillary electrophoresis, the degradation products of an aqueous solution of the studied substance were analysed by stress tests. They were used to study the effect of thermal treatment on VMA-13-15 in the presence of 0.1 M hydrochloric acid solution and 0.1 M sodium hydroxide solution. We found that the alkaline environment had the greatest effect on the stability of N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine. It was consistent with the results of the computational experiment. We studied the mass spectrum of the degradation product detected during thermostatic treatment in alkaline medium. Based on its molar mass and release time, it was confirmed that the impurity on the chromatograms of VMA-13-15 is unsubstituted quinazolin-4(3H)-one, the initial product of the synthesis.

Keywords: N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine, computer modelling, thermodynamic calculations, degradation products, capillary electrophoresis, stress testing, mass spectroscopy.

For citation: Lutsenko D.N., Kompantseva E.V., Chiriapkin A.S., Garsiya E.R., Ozerov A.A., Slivkin A.I., Selemenev V.F., Shikhaliev Kh.S., Kodonidi I.P. Study of the stability of the biologically active compound N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine using electrophoresis and mass spectrometry. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 257-267. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12128>

Введение

Актуальной медицинской проблемой является терапия сердечно-сосудистых заболеваний, решение которой, в частности, связано с разработкой новых современных кардиопротекторов. В настоящее

время перспективной группой биологически активных соединений (БАС) с потенциальными кардиопротекторными свойствами могут быть пиримидиновые производные гуанидина. В связи с этим на кафедре фармацевтической и токсикологической химии и в лаборатории син-



теза научного центра инновационных лекарственных средств ВолгГМУ сконструирован и целенаправленно синтезирован ряд пиримидиновых производных гуанидина для исследования их в качестве возможных ингибиторов натрий-водородного обмена 1-го типа (NHE-1) [1-4]. По данным фармакологического скрининга среди синтезированных пиримидиновых производных гуанидина перспективным соединением может быть N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15) [5]. При создании нормативной документации для нового лекарственного средства одним из критериев качества является показатель «Родственные примеси», которыми могут быть технологические реагенты и продукты деструкции действующего вещества [6]. В связи с этим, необходимо получение данных об изменении качества будущего лекарственного средства при его хранении под влиянием различных факторов окружающей среды, которые могут оказать воздействие на его качество, безопасность и/или эффективность [7]. Таким образом, анализ продуктов деградации и технологических примесей представляет собой актуальную задачу в фармацевтическом анализе. Целью исследования является изучение стабильности перспективного биологически активного соединения – N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

Экспериментальная часть

In silico исследования. Оптимизация геометрии рассматриваемых виртуальных структур проводилась с использованием метода молекулярной механики MM+ в программе Nucleus 8.0.9 [8]. Далее расчеты осуществлялись неограниченным методом Хартри-Фока в базисе 3-21G*, а для завершающей пространственной оптимизации геометрии молекул был использован метод теории функционала плотности $ub3lyp$ [9] с базисным набором 6-311G** [10]. Результирующий

колебательный анализ термодинамических характеристик проводился в программе Orca [11].

Моделирование термодинамических характеристик позволило получить значения энтальпий (H) и энтропий (S) для изучаемых соединений. Далее по этим данным для каждой рассматриваемой реакции согласно следствию закона Гесса был произведен расчет значения энтальпии реакции (ΔH) по формуле $\Delta H = \sum \Delta H_{\text{(продукты реакции)}} - \sum \Delta H_{\text{(исходных веществ)}}$. Также было рассчитано значение энтропии реакции (ΔS) по формуле $\Delta S = \sum \Delta S_{\text{(продукты реакции)}} - \sum \Delta S_{\text{(исходных веществ)}}$.

Вычисления энергии Гиббса реакции (ΔG) производилось по формуле $\Delta G = \Delta H - \Delta S \cdot T$, где значение температуры (T) принимали за 273 градуса Кельвина [9]. Константу равновесия реакции (K) рассчитывали по формуле $K = \exp \frac{-\Delta G}{RT}$, где ΔG – энергия Гиббса реакции; T – температура при 273 градусах Кельвина; R – универсальная газовая постоянная, равная $8.31 \cdot 10^{-3}$ кДж/(моль×К) [12, 13].

Фармацевтические исследования. Получение предполагаемых продуктов деградации проводили методом стрессовых испытаний [7]. Для этого готовили растворы по методике: 0.01 г (точная навеска) образца N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина помещали в мерную колбу на 100 см³, добавляли 30 см³ воды очищенной, взбалтывали до полного растворения и доводили этим же растворителем до метки (раствор А). К 2.5 см³ раствора А прибавляли равные объемы воды или 0.1 М раствора кислоты хлористоводородной или 0.1 М натрия гидроксида, перемешивали и помещали в термостат при температуре 60°C. По окончании процесса термостатирования (через 5, 10 и 15 часов соответственно) растворы охлаждали, далее при помощи микропипетки отбирали 1000 мкл, переносили в пробирки типа Эппендорф и центрифугировали при 12000 мин⁻¹ в течение 5 мин. Полученные растворы

декантировали и подвергали анализу с использованием капиллярного электрофореза, методика которого описана в ранее опубликованной нами работе [14].

ВЭЖХ-МС анализ проводили при помощи хроматографа Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США). Использовали колонку Phenomenex Luna C18/2 (5 мкм, 150x4.6 мм, Phenomenex, США). Подвижная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и 0.5% муравьиной кислоты в соотношениях 20:80. Скорость потока составила 0.5 см³/мин, объем пробы 20 мкл. МС-детектирование осуществляли методом ионизации электрораспылением (ESI) с использованием спектрометра Bruker Amazon SL (Bruker, США). Масс-спектр регистрировали в режиме положительной ионизации в диапазоне 50-300 m/z. Напряжение на капилляре 4.5 кВ, температура интерфейса 250°C, скорость газа-осушителя 10 дм³/мин, газ ионной ловушки – гелий (давление 30 psi). Для анализа использовался раствор БАС (раствор А), смешанный с 0.1 М раствором натрия гидроксида после термостатирования в течении 10 часов.

Обсуждение результатов

Изучение молекулы исследуемого БАС с использованием компьютерных технологий позволило предположить возможные процессы деструкции (рис.1-4).

Очевидно, что соединение VMA-13-15 устойчиво в кислой среде. При невысоких значениях температур оно образует дизамещенную соль. На рис.1 приведена реакция образования соли дигидрохлорида на примере взаимодействия VMA-13-15 с хлористоводородной кислотой. Так как хлористоводородная кислота является сильной, то согласно протеолитической теории Бренстеда, она существует в водной среде в виде аниона хлора и гидроксония [12], который и участвует в протонировании соединения VMA-13-15.

При длительном воздействии кислой среды и повышении температуры проис-

ходит реакция гидролиза с участием хлористоводородной кислоты в протонировании продуктов гидролиза с образованием солей (рис. 2).

В слабо щелочной среде (реакция III) прогнозируется, что соединение также подвергается гидролизу с образованием соли (рис. 3). Кроме того, известно, что производные гуанидина могут в щелочной среде конденсироваться до производного бигуанида (реакция VI). Примеры предполагаемого радикального окисления VMA-13-15 приведены на рис. 4.

Для расчета значения энтальпии и энтропии для рассматриваемых вариантов деструкции соединения VMA-13-15 (реакции I-VI, рис.1-4), использовали данные *in silico* моделирования. Результаты, приведенные в табл. 1, свидетельствуют, что все реакции, кроме IV, являются экзотермическими.

С целью выяснения возможности протекания изучаемых реакций была рассчитана энергия Гиббса (ΔG) с использованием приведенных значений энтальпии и энтропии для реакций при нормальных условиях (табл. 1). В случае, если энергия Гиббса реакции меньше нуля, то можно говорить о возможности протекания химического взаимодействия между участниками химического процесса. Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что экспериментально осуществима деструкция соединения VMA-13-15 по всем предполагаемым реакциям кроме IV. Реакция разложения VMA-13-15 в щелочной среде с конденсацией двух молекул VMA-13-15 до производного бигуанида в предложенном стехиометрическом виде невозможна. Наиболее легко протекаемой является реакция III – $\Delta G = -354.967$ кДж/моль. В результате квантово-химических расчетов подтверждается предположение о наличии у соединения VMA-13-15 антирадикальной активности за счет наличия в α -положении пропионо-

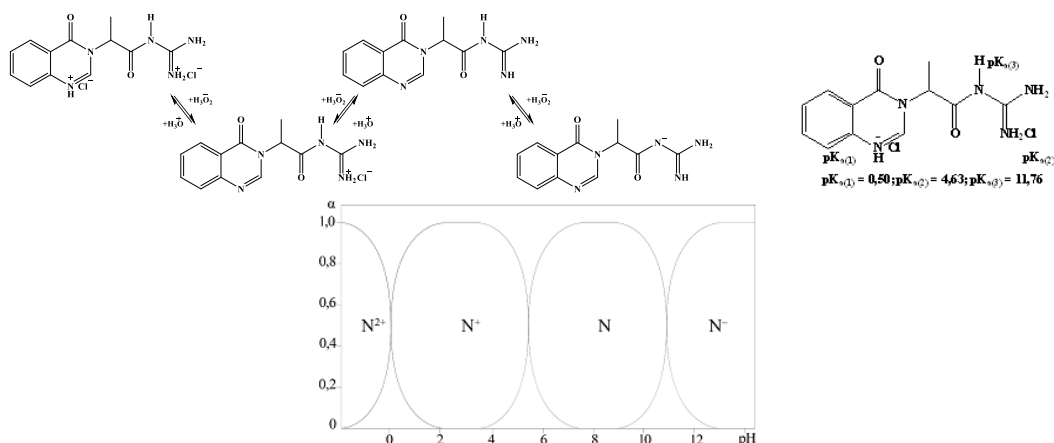


Рис. 1. Схема образования дизаминозамещенной соли соединения VMA-13-15 в слабо-кислой среде (I)

Fig. 1. Scheme of the formation of the dizamino-substituted salt of VMA-13-15 in weakly acidic medium (I)

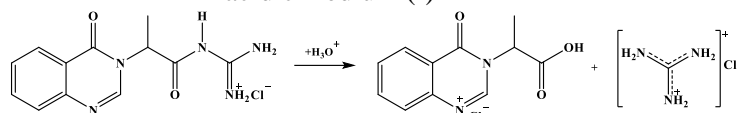


Рис. 2. Схема гидролиза соединения VMA-13-15 в сильнокислой среде (II)

Fig. 2. Scheme of hydrolysis of the compound VMA-13-15 in a strongly acidic medium (II)

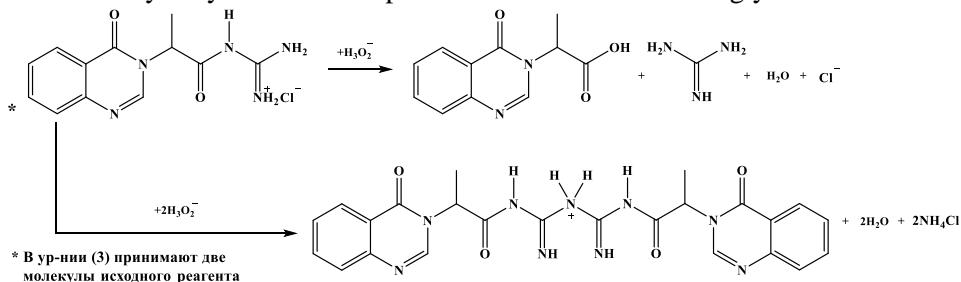


Рис.3. Схема гидролиза (III) и конденсации (IV) соединения VMA-13-15 в слабо и сильнощелочной среде

Fig. 3. Scheme of hydrolysis (III) and condensation (IV) of the VMA-13-15 compound in a weakly and strongly alkaline medium

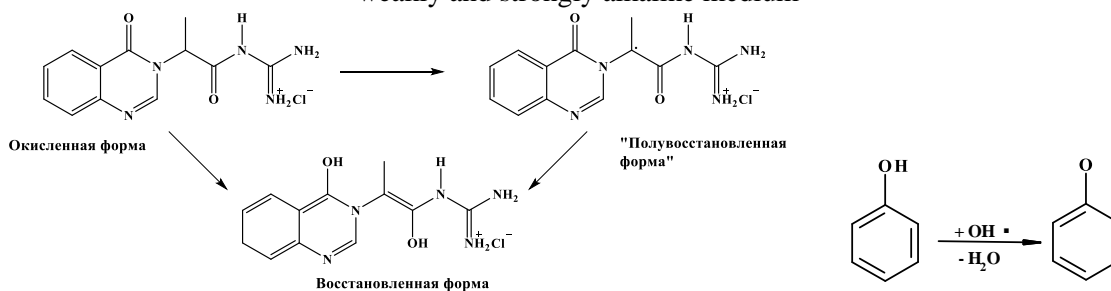


Рис. 4. Схемы радикального окисления соединения VMA-13-15 (V) и фенола (VI)

Fig. 4. Schemes of radical oxidation of the compound VMA-13-15 (V) and phenol (VI)

вого фрагмента. Для сопоставления предполагаемой выраженности антирадикальных свойств соединения VMA-13-15 рассмотрена реакция антирадикальной активности на примере фенола (реакция

VI). Очевидно, что соединения без гидроксильного заместителя уступает фенолу почти в два раза по возможной антирадикальной активности.

Полноту протекания предложенных реакций деструкции соединения VMA-

Таблица 1. Значения энтальпии, энтропии, энергии Гиббса и константы равновесия моделируемых реакций при нормальных условиях для предложенных реакций деструкции (рис. 1-4)

Table 1. Enthalpy, entropy, Gibbs energy, and equilibrium constants of modelled reactions under normal conditions for the proposed degradation reactions (Fig. 1-4)

Номер реакции	Энтальпия ΔH , кДж/моль	Энтропия ΔS , кДж/моль·К	Энергия Гиббса (ΔG), кДж/моль	Константа равновесия (K)
I	-148.078	-0.05	-146.74	$1.23 \cdot 10^{28}$
II	-201.639	0.041	-212.941	$5.81 \cdot 10^{40}$
III	-354.967	-0.269	-281.503	$7.75 \cdot 10^{53}$
IV	24.417	-0.013	27.966	$4.43 \cdot 10^{-6}$
V	-69.839	-0.012	-66.7	$5.87 \cdot 10^{12}$
VI	-120.51	0.017	-125.233	$9.41 \cdot 10^{23}$

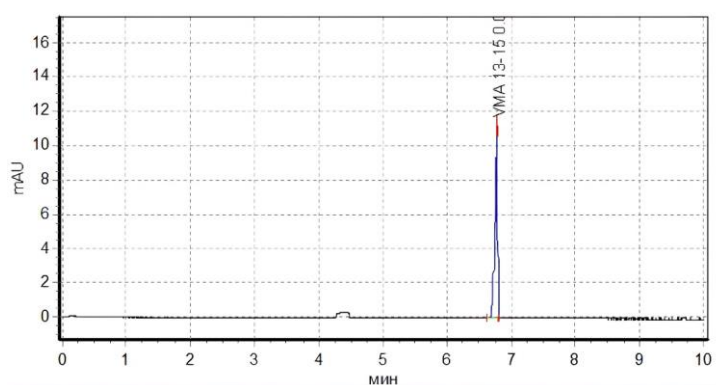


Рис. 5. Электрофореграмма водного раствора N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина после термостатирования в течении 15 часов

Fig. 5. Electropherogram of aqueous solution of N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine after thermostating for 15 hours

13-15 определяют также по значению константы равновесия (K) при нормальных условиях (табл. 1). При высоких значениях константы равновесия химическое равновесие сдвинуто в сторону продуктов реакции, а при малых - в обратную сторону. Таким образом, наиболее полно протекает реакция образования кислоты соединения VMA-13-15 в щелочной среде – реакция III. Химическое равновесие реакции IV смещено в сторону исходных соединений реакции, что согласуется с полученным значением энергии Гиббса.

Для оценки химической стабильности соединения VMA-13-15 были проведены стрессовые испытания с целью выявления процесса деградации и установления продуктов разложения потенциального лекарственного средства [11]. В связи с тем, что соединения VMA-13 можно отнести к классу амидов, оно, как показали

результаты компьютерного прогноза, подвергается гидролитическому расщеплению. Чаще всего этот процесс катализируют ионы гидроксония и гидроксид-ионы [15].

Возможные продукты деструкции из предложенных нами реакций изучались методом капиллярного электрофореза. Для проведения анализа использовали водный раствор БАС. Первым на процесс деградации было исследовано влияние температуры. Водный раствор VMA-13-15 выдерживали в термостате при температуре 60°C. Анализ раствора проводили через 5, 10 и 15 часов термического воздействия (рис.5), по ранее описанной методике [14, 16]. Из представленной электрофореграммы (рис. 5) следует, что при термическом воздействии на водный раствор БАС в течение 15 часов не наблюдается появление дополнительных

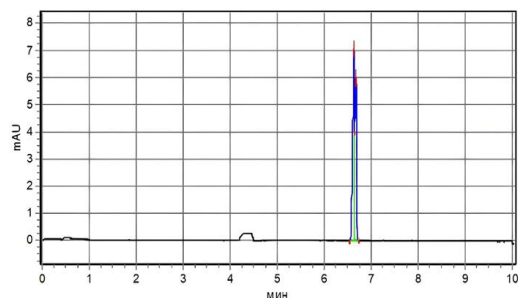


Рис. 6. Электрофореграмма водного раствора N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной через 10 часов термического воздействия

Fig. 6. Electropherogram of aqueous solution of N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine with 0.1 M hydrochloric acid solution after 10 hours of thermal treatment

пиков, относящихся к продуктам деградации VMA-13-15.

При воздействии на БАС кислоты хлористоводородной 0.1 М раствора через 10 часов термостатирования на электрофореграмме при времени миграции в интервале от 6.58 до 6.62 мин наблюдается появление неразделенного пика VMA-13-15 (рис. 6).

При изучении электрофореграмм водного раствора БАС с раствором натрия гидроксида при термическом воздействии следует, что через 5 часов появился пик со временем удерживания 4.46. Через 10 часов, кроме основного пика со временем миграции 6.72 и пика со временем миграции 4.44, появились дополнительные пики со временем миграции 8.1 и 9.6 мин. (рис.7). Через 15 часов термостатирования наблюдали появление четырех не идентифицированных пиков со временем миграции 4.49, 8.23, 8.40 и 9.94 мин. Таким образом, при использовании стресс тестов наибольшее влияние на процесс деградации БАС в водном растворе оказывает щелочная реакция среды. Эти данные подтверждают результаты прогнозирования возможных путей разложения исследуемого соединения с помощью компьютерных технологий, в которых отмечено, что наиболее легко и

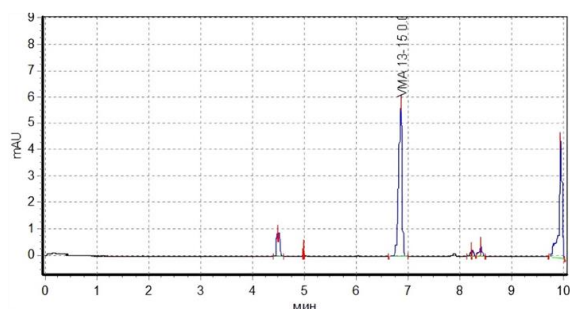


Рис. 7. Электрофореграмма водного раствора N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с натрия гидроксида 0,1 М раствором через 10 часов термического воздействия

Fig. 7. Electropherogram of aqueous solution of N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine with 0.1 M sodium hydroxide solution after 10 hours of thermal treatment

полно может протекать реакция в щелочной среде – реакция III (наибольшее значение энергии Гиббса).

При изучении возможных родственных примесей исследуемого БАС методом капиллярного электрофореза в одном из лабораторных образцов были обнаружены следовые количества соединения со временем миграции пика 4.52 мин, который оказался идентичным по времени миграции исходному веществу синтеза VMA-13-15 – незамещенного хиназолин-4(3H)-она (рис. 8, VMA-10-18) [16].

Аналогичный пик был обнаружен нами уже после 5 часов термостатирования при использовании щелочной среды в стрессовых испытаниях. Как следует из представленной схемы деградации VMA-13-15 (рис. 3), данный пик можно отнести к 2-[хиназолин-3(4H)-ил]пропионовой кислоте или дальнейшему предполагаемому продукту деградации – незамещенного хиназолин-4(3H)-она. Его присутствие можно отнести как продукту деградации, так и к технологической примеси (исходное вещество, используемое для синтеза БАС) [6]. В связи с этим представляет интерес проведение идентификации возможного продукта деградации, который может появляться в БАС в первую очередь.

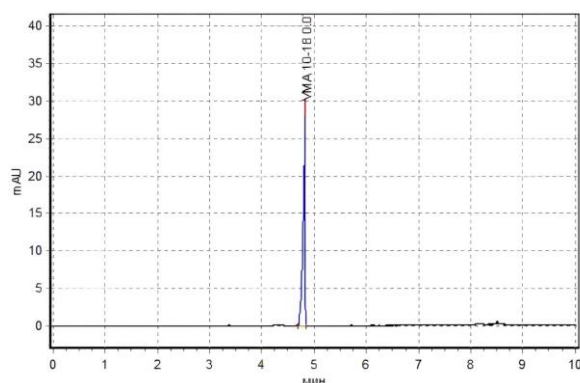


Рис. 8. Электрофореграмма раствора незамещенного хиназолин-4(3H)-она
Fig. 8. Electrophoregram of a solution of unsubstituted quinazolin-4(3H)-one

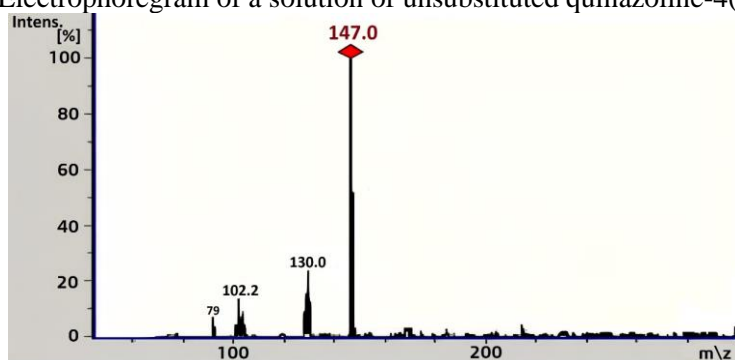


Рис. 9. Масс-спектр предполагаемой примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она
(Характеристичные m/z (интенсивность): 147(100),130(25),102(18),79(8))

Fig. 9. Mass spectrum of the anticipated impurity of unsubstituted quinazolin-4(3H)-one
(characteristic m/z (intensity): 147(100),130(25),102(18),79(8))

Для подтверждения структуры примеси проводили анализ с помощью метода ВЭЖХ-МС. Идентификацию незамещенного хиназолин-4(3H)-она подтверждали по значениям времени удерживания и данным pubchem.ncbi.nlm.nih.gov [17, 18] Обработку первичных данных проводили в программе CompassDataAnalysis.

В результате совпадения времени удерживания (4.46 мин) и характеристикам масс-спектра (М.м 147) (рис. 9) продукт деградации, образующийся при термостатировании в щелочной среде, был идентифицирован как незамещенный хиназолин-4(3H)-он (М.м 146.146).

Параллельно были проверены лабораторные образцы N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, полученные в 2017, 2019, 2021, 2022 годах на возможность появления примесей при их хранении в хорошо закупоренных склян-

ках темного стекла при комнатной температуре [16]. Как указывалось выше, только в одном образце 2017 года нами был обнаружен дополнительный пик со временем миграции 4.5 мин. Таким образом, можно предположить, что при хранении исследуемого БАС в твердом состоянии он может быть стабилен в течении 3-5 лет. А особое внимание к его стабильности следует обращать при создании лекарственных препаратов в виде растворов с целью обоснования и выбора соответствующего стабилизатора и условий хранения.

Заключение

С помощью компьютерных технологий спрогнозированы возможные процессы деградации N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и рассчитаны термодинамические характеристики химических реакций. Показано,



что наиболее легко и полно может протекать реакция гидролиза при термостатировании раствора исследуемого соединения в щелочной среде.

Методом капиллярного электрофореза и хромато-масс-спектрометрии проведен анализ деградации водного раствора БАС с помощью «стресс-тестов» путем изучения влияния термического воздействия в присутствии 0.1M растворов кислоты хлористоводородной и натрия гидроксида. Установлено, что наибольшее влияние на стабильность N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина оказывает щелочная среда.

С использованием масс-спектрометрии установлено, что при термостатиро-

вании в щелочной среде образуются продукт деградации (время миграции 4.5 мин). По совпадению молярной массы и времени выхода было подтверждено, что эта примесь на хроматограммах N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина является незамещенным хиназолин-4(3H)-оном – исходным продуктом синтеза БАС.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Gurova N.A., Ozerov A.A., Gurova V.V. Search and study of Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors among quinazoline derivatives containing a free guanidine group. *Experimental and Clinical Pharmacology*, 2018; 81(S): 66.

2. Linz W.J., Busch A.E. NHE-1 inhibition: from protection during acute ischaemia/reperfusion to prevention/reversal of myocardial remodelling. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2003; 368(4): 239-246. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-08-2>

3. Hu Y., Lou J., Jin Z., Yang X., Shan W., Du Q., Liao Q., Xu J., Xi, R. Advances in research on the regulatory mechanism of NHE1 in tumors (Review). *Oncology Letters*, 2021; 21(4): 273. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12534>

4. Karmazyn M., Pierce G.N., Fliegel L. The Remaining Conundrum of the Role of the Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1 (NHE1) in Cardiac Physiology and Pathology: Can It Be Rectified? *Rev. Cardiovasc. Med*, 2022; 23(8): 284. <https://doi.org/10.31083/j.rcm2308284>.

5. Petrov V.I. [et al]. Patent of the Russian Federation, No. 2622638, 2017. (In Russ.)

6. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 15th ed. Moscow: Ministry

of Health of the Russian Federation; 2023. OFS.1.1.0023. Related impurities in pharmaceutical substances and medicines. (In Russ.)

7. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 15th ed. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2023. OFS.1.1.0009 Stability and shelf life of medicines. (In Russ.)

8. Teppen B.J. HyperChem, release 2: molecular modeling for the personal computer. *J. Chem. Inf. Comput Sci*, 1992; 32: 757-759.

9. Stephens P.J., Devlin F.J., Chabalowski C.F., Frisch M.J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J. Phys*, 1994; 98(45): 11623-11627. <https://doi.org/10.1021/j100096a001>.

10. Minkin V.I., Simkin B.Ya., Minyaev R.M. The structure of molecules. Rostov N/D: Phoenix, 1997. 560 p. (In Russ.)

11. Neese Fr., Wennmohs Fr., Becker Ute, Riplinger Ch. The ORCA quantum chemistry program package. *J. Chem. Phys*, 2020; 152(22): 224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>

12. Zuev A.Yu., Tsvetkov D.S. Chemical thermodynamics. Yekaterinburg: Ural Publishing House. unita, 2020. 183 p. (In Russ.)

13. Kodonidi I.P., Chiriapkin A.S., Morozov A.V., Smirnova L.P., Ivchenko A.V.,



Zhilina O.M. Synthesis and thermochemical modeling of reaction mechanism for producing N-acyl derivatives of 2-(2-oxo-1-pyrrolidine-1-yl) – acetamide. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol. [Russ. J. Chem. & Chem. Tech.]*. 2020; 63(2): 38-44. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20206302.6080>. (In Russ.)

14. Kompantseva E.V., Lutsenko D.N., Garcia E.R. Determination of biologically active compounds N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine by capillary electrophoresis. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*, 2020; 23(10): 40–45. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-06>. (In Russ.)

15. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 15th ed. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2023. OFS.1.1.0026 Aspects of drug stability. (In Russ.)

16. Kompantseva E.V., Lutsenko D.N., Garcia E.R., Ozerov A.A., Dementieva T.M.

Development of a method for determining related impurities in a new biologically active compound of cardioprotective action by capillary electrophoresis. *Humans and their health*, 2023; 26(2): 73-79. <https://doi.org/10.21626/vestnik/2023-2/09> (In Russ.)

17. Kim S., Bolton E.E. PubChem: A Large-Scale Public Chemical Database for Drug Discovery. In Daina A, Przewosny MT, Zoete V, eds. Open Access Databases and Datasets for Drug Discovery. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, 2023; 83: 41-66. <https://doi.org/10.1002/9783527830497.ch2>

18. Palm E.H., Chirsir P., Krier J., Thiesen P.A., Zhang J., Bolton E.E., Schymanski E.L. ShinyTPs: Curating Transformation Products from Text Mining Results. *Environ Sci Technol Lett*, 2023; 10(10): 865-871. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-xm41h>

Информация об авторах / Information about the authors

Д.И. Луценко – учебный мастер кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия

Е.В. Компанцева – д.фарм.н., профессор, профессор кафедры фармацевтической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия

А.С. Чиряпкин – преподаватель кафедры фармацевтической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия

Е.Р. Гарсия – к.фарм.н., преподаватель кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия

D.I. Lutsenko – educational master of the department of pharmacology with a course in clinical pharmacology of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russian Federation, e-mail: lucenkodasha95@mail.ru

E.V. Kompantseva – grand Ph.D (pharmacy), professor, professor of the department of pharmaceutical chemistry of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russian Federation, e-mail: dskompanceva@mail.ru

A.S. Chiriapkin – lecturer of the department of pharmaceutical chemistry of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russian Federation, e-mail: alexey.chiriapkin@yandex.ru

E.R. Garsiya – Ph.D (pharmacy), lecturer of the department of pharmacognosy, botany and technology of phytopreparations of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russian Federation, e-mail: x-pharm@mail.ru



А.А. Озеров – д.х.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «ВолГМУ» Минздрава России, Волгоград, Россия, e-mail: ozerov@vlink.ru

А.И. Сливкин – д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

В.Ф. Селеменев – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Х.С. Шихалиев – д.х.н., профессор, зав. кафедрой органической химии, Воронежский государственный университет, e-mail: shikh1961@yandex.ru

И.П. Кодониди – д.фарм.н., доцент, зав. кафедрой фармацевтической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО «ВолГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия

A.A. Ozerov – grand Ph.D (chemistry), professor, manager chair of pharmaceutical and toxicological chemistry of Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Volgograd, Russian Federation. E-mail: ozerov@vlink.ru

A.I. Slivkin – grand Ph.D (pharmacy), professor, Head of the Department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: slivkin@pharmvsu.ru

V.F. Selemenev – grand Ph.D (chemistry), Professor of the Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Kh.S. Shikhaliev – grand Ph.D (chemistry), Professor, Head of the Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, e-mail: shikh1961@yandex.ru

I.P. Kodonidi – grand Ph.D (pharmacy), docent, Head of the Department of pharmaceutical chemistry of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russian Federation, e-mail: kodonidiip@mail.ru

Статья поступила в редакцию 29.02.2024; одобрена после рецензирования 3.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 29.02.2024; approved after reviewing 3.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544.943.3.068.7

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12132

Тонкослойная хроматография метилированных производных алкилбензолсульфонатов натрия в анализе воды методом ГХ-МС

Алёна Александровна Никонова¹✉, Елена Филипповна Рохина²,
Ольга Юрьевна Глызина¹, Светлана Дамбаевна Дылгерова^{1,2},
Анна Николаевна Чиндявская^{1,3}, Александр Валерьевич Рохин²,
Алексей Гаврилович Пройдаков²

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия, alenaxis@list.ru✉

²Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация. Алкилбензолсульфонаты натрия (АБС) являются наиболее распространенными анионными синтетическими поверхностно-активными веществами (АСПАВ) и загрязнителями вод, способными вызывать как острое так и хроническое токсическое воздействие на гидробионты. Селективное определение алкилбензолсульфонатов натрия как отдельного класса АСПАВ в сложных природных матрицах возможно методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) в форме метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот (МЭ АБСК). С целью очистки экстрактов и концентрирования аналитов изучено поведение АБС и МЭ АБСК в условиях восходящей высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием пластин «Kieselgel 60 F₂₅₄» и «Sorbfil». В качестве подвижной фазы предложено использование смеси растворителей *n*-гексан : метанол в соотношении 23 : 1 (по объему). В указанных условиях алкилбензолсульфонаты натрия остаются на линии старта, в то время как их производные (МЭ АБСК), полученные метилированием триметилортоформиатом в присутствии трифторуксусной кислоты (выход $\eta=98\%$), образуют зоны, характеризующиеся значениями коэффициентов удерживания $R_f = 0.62$ и $R_f = 0.71$ на пластинах «Kieselgel 60 F₂₅₄» и «Sorbfil» соответственно. Повторяемость оценки значений R_f охарактеризована среднеквадратичным отклонением 6.1 и 5.9% соответственно ($n=16$). Отмечена полнота экстракции (95.0-100.0%) аналитов с пластин методом нисходящей ТСХ ацетонитрилом. Показана применимость метода ТСХ для концентрирования аналитов и доочистки экстрактов на примере реальных проб воды. С помощью метода ГХ-МС с ионизацией электронным ударом найдены концентрации алкилбензолсульфонатов натрия в воде, отобранной в южной котловине озера Байкал с глубины 400 м (0.24 ± 0.02 мкг/дм³) и в воде, полученной при таянии снега, отобранного со льда р. Крестовка в месте впадения ее в оз. Байкал в районе пос. Листвянка (31.1 ± 1.0 мкг/дм³).

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, ТСХ, силикагель, АСПАВ, алкилбензолсульфонаты натрия, метиловые эфиры сульфокислот, ГХ-МС, АСПАВ в воде, оз. Байкал.

Благодарности: исследование выполнено в рамках гос. задания Министерства науки и ВО РФ № 0279-2021-0005 «Исследование трансформации водоемов и водотоков Восточной Сибири...» с использованием оборудования Приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикроранализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикроранализ») на базе Уникальной научной установки «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» УНУ ПАК.

Искренняя благодарность сотрудникам лаборатории микробиологии углеводов ЛИН СО РАН за использование оборудования для визуализации пластин и директору ЛИН СО РАН д.г.-м.н. Федотову А.П. за поддержку.

Для цитирования: Никонова А.А., Рохина Е.Ф., Глызина О.Ю., Дылгерова С.Д., Чиндявская А.Н., Рохин А.В., Пройдаков А.Г. Тонкослойная хроматография метилированных производных алкилбензолсульфонатов натрия в анализе воды методом ГХ-МС // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 268-280. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12132>



Original article

Thin layer chromatography of methylated derivatives of sodium alkylbenzenesulphonates in water analysis by GC-MS

Alena A. Nikonova¹✉, Elena F. Rokhina², Olga Yu. Glyzina¹, Svetlana D. Dylgerova^{1,2}, Anna N. Chindyavskaya^{1,3}, Alexander V. Rokhin², Alexey G. Proydakov²

¹Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, alenaxis@list.ru ✉

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Sodium alkylbenzenesulphonates (SABS) are the most common anionic synthetic surfactants (ASS). They can cause both acute and chronic toxic effects on hydrobionts. Selective determination of sodium alkylbenzenesulphonates as a separate class of ASS is possible using gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) in the form of methyl esters of alkylbenzenesulphonic acids (ME ABSA). In order to purify the extracts and concentrate the analytes, we studied the behaviour of these compounds by ascending high-performance thin-layer chromatography using Kieselgel 60 F₂₅₄ and Sorbfil plates. A mixture of *n*-hexane and methanol solvents in a ratio of 23:1 (by volume) was used as the mobile phase. Under these conditions, sodium alkylbenzenesulphonates remain on the start line, while their derivatives (ME ABSC), obtained by methylation with trimethyl orthoformate in the presence of trifluoroacetic acid (with a yield of $\eta=98\%$), form zones characterised by retention coefficient values of $R_f = 0.62$ and $R_f = 0.71$ on Kieselgel 60 F₂₅₄ and Sorbfil plates, respectively. The repeatability of the R_f values was characterised by a standard deviation of 6.1 and 5.9 %, respectively ($n=16$). The completeness of extraction (95.0–100.0 %) of analytes from the plates by descending TLC with acetonitrile was noted. The applicability of the TLC method for the concentration of analytes and pretreatment of extracts on the example of real water samples was shown. Using GC-MS with electron impact ionisation, we determined the concentrations of sodium alkylbenzenesulphonates in water sampled in the southern basin of Lake Baikal from a depth of 400 m ($0.24 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{dm}^3$) and in snowmelt water from the ice of the Krestovka River where it flows into Lake Baikal near the village of Listvyanka ($31.1 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{dm}^3$). **Keywords:** thin layer chromatography, TLC, silica gel, ASS, sodium alkylbenzenesulphonates, methyl esters of alkylbenzenesulphonic acids, GC-MS, ASS in water, Lake Baikal.

Acknowledgments: the study received financing within the framework of state order of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 0279-2021-0005 “Study of the transformation of reservoirs and watercourses in Eastern Siberia...” using equipment of the Centre for Collective Use of Physico-Chemical Ultramicroanalysis of Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Centre for Collective Use “Ultramicroanalysis”) on the basis of the Unique scientific installation “Experimental freshwater aquarium complex of Baikal hydrobionts” of the Centre for the Collective Use of Freshwater aquarium complex.

The authors express their gratitude to the staff of the laboratory of microbiology of hydrocarbons of the Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for the use of equipment for visualization of plates and to A.P. Fedotov, Doctor of Geological and Mineralogical Sciences, director of the Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, for their support.

For citation: Nikonova A.A., Rokhina E.F., Glyzina O.Yu., Dylgerova S.D., Chindyavskaya A.N., Rokhin A.V., Proydakov A.G. Thin layer chromatography of methylated derivatives of sodium alkylbenzenesulphonates in water analysis by GC-MS. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 268-280. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12132>

Введение

На долю алкилбензолсульфонатов натрия (АБС), широко известных в мировой литературе под названием *Linear Alkylbenzene Sulfonates* (LAS), приходится порядка 80% производства всех анионных поверхностно-активных веществ [1-

3]. Использование АБС в быту в качестве основы моющих средств и стиральных порошков, в сельском хозяйстве в качестве эмульгаторов для инсектицидов и гербицидов, в текстильной промышленности, в сфере рекреации, в частности при производстве искусственного снега на горнолыжных курортах, в нефтяной и

металлургической промышленности при извлечении остаточной нефти и обогащении пород приводит к загрязнению вод данными веществами [1-4].

Согласно Программе ООН по окружающей среде алкилбензолсульфонаты натрия отнесены к веществам, «опасным» для водных экосистем [4] и к веществам, «особо опасным» для озера Байкал согласно приказу № 83 Минприроды России [5]. В РФ ПДК алкилбензолсульфонатов в воде водоемов рыбохозяйственного значения составляет 30 мкг/дм³ [6]. Их острое и хроническое токсическое действие на рыб и водных животных [7-10], растения и фитопланктон [7, 11-13] проявляется уже при концентрациях 5-20 мкг/дм³. Кроме того, АБС токсичны для человека, являются аллергенами, индуцируют развитие респираторных заболеваний [14], экспрессию белков и пролиферацию раковых клеток [15]. Поэтому контроль алкилбензолсульфонатов в воде является важной задачей.

В отличие от методов спектрофотометрии и флуориметрии, которые позволяют определять суммарное содержание анионных синтетических поверхностно-активных веществ (АСПАВ) разных классов, селективное определение алкилбензолсульфонатов натрия как отдельного класса анионных сурфактантов в воде возможно методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) [2, 16-20]. Этот метод обладает максимальной чувствительностью, позволяя разделять отдельные изомеры в отличие от метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Тем не менее метод ГХ не нашел широкого развития в связи с рядом трудностей при дериватизации алкилбензолсульфонатов натрия. Так основным недостатком десульфирования данных соединений являются жесткие условия реакции и образование побочных продуктов, искажающих результаты анализа. Алкилирование или хлорирование зача-

стую дает недостаточный выход продуктов реакции либо требует использования высокотоксичных реагентов, таких как diazometan, трифторэтанол, метилфторсульфонат, четвертичные соединения аммония, тионил хлорид, пентахлористый фосфор [21]. В 2023 г. предложен новый способ дериватизации АБС малотоксичным триметилортоформиадом, обеспечивающий хороший выход ($\eta=98\%$) метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот и возможность их определения методом ГХ-МС [16]. Развитие метода ГХ-МС требует развития способов подготовки проб. Как показывает практика, степень очистки экстрактов АБС методом ТФЭ на патронах с полимерными сорбентами [2], графитизированным углеродом [18, 19], обращенно-фазными сорбентами с привитыми группами C8 и C18 [20, 22], а также с нанопористым углеродистым сорбентом с кристаллической структурой, недостаточна для ГХ-МС анализа [22].

Тонкослойная хроматография (ТСХ) может быть одним из потенциально-возможных методов очистки экстрактов природных проб от компонентов матрицы. В литературе говорится о возможности разделения стандартных растворов алкилбензолсульфонатов натрия и сурфактантов других классов в тонких слоях оксида алюминия при элюировании изопропанолом, и в тонких слоях закрепленного целлюлозой полиамида при элюировании сложным элюентом, включающим смесь 0.1 М раствора аммиака и пиридина в соотношении 15 : 1, а также смесь 0.1 М раствора аммиака, пиридина и метанола при соотношении растворителей от 15 : 1 : 0 до 15 : 1 : 15 [23]. Показана возможность разделения стандартных растворов алкилбензолсульфонатов, алкилсульфатов, сульфатов и сульфоэтоксилатов жирных спиртов на пластинах «Силикагель 60» с использованием подвижных фаз сложного состава [24].

Работ, касающихся применения ТСХ при анализе анионных ПАВ в природных

объектах практически не найдено в мировых базах данных, включая Scopus и Science Direct. В обзоре Римцма [21] упоминается использование ТСХ при анализе алкилбензолсульфонатов в форме их вторичных дериватов в поверхностных водах методом инфракрасной (ИК) спектроскопии. В другом обзоре говорится о применении ТСХ для анализа катионных поверхностно-активных веществ методом ИК-спектроскопии [25]. Известно применение ТСХ на пластинах с обращенной фазой «Whatman KC-18» для оценки чистоты синтезированных додецилбензолсульфоната и его изотопномеченного аналога, а также для разделения этих соединений и их метаболитов в экстрактах клеток печени рыб (гепатоцитов) при изучении биотрансформации данных токсикантов. Детектирование проведено с использованием сканера радиоактивного излучения (радио-ТСХ) [26]. Подобные исследования проведены для оценки биодegradации додецилбензолсульфоната в почвах методом радио-ТСХ на пластинах с силикагелем (0.25 мкм, Macherey-Nagel, Германия) с оценкой остаточной радиации посредством жидкостного сцинтилляционного счетчика [27]. Также для анализа алкилбензолсульфонатов могут быть использованы пластины с силикагелем, импрегнированным раствором сульфата аммония с добавками метилизобутилкетона, уксусной кислоты и ацетонитрила [28].

Тонкослойная хроматография продуктов дериватизации алкилбензолсульфонатов натрия практически не изучена. Отмечено, что продукты десульфирования алкилбензолсульфонатов могут быть хроматографированы на пластинах, модифицированных нитратом серебра с последующей экстракцией и анализом методом ГХ-МС с ионизацией электронным ударом [28].

Целью данной работы является подбор условий хроматографирования метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот с

длиной алкильной цепи C10-C13 методами восходящей и нисходящей ТСХ на пластинах с силикагелем для доочистки экстрактов проб воды (природной, снеговой, сточной) и концентрирования фракции аналитов с их последующим анализом методом ГХ-МС.

Экспериментальная часть

Стандартные образцы, реагенты, растворители. В работе использован государственный стандартный образец ГСО 8578-2004 состава алкилбензолсульфонат (ООО «АНАЛИТИК-ХИМ», Россия), представляющий собой водный раствор натриевых солей 20-ти изомеров алкилбензолсульфоната натрия, входящих в состав 4-х гомологических групп, с общей концентрацией $C=100.2\pm 0.1$ мг/см³ и долей гомологов C10-C13 13.8±0.9%, 31.9±0.7%, 30.4±0.9% и 23.9±1.2% соответственно. Метилирующий реагент – триметилортоформиат (ТМОФ) (≥99.0% «КЕМСТОР», Россия). Катализатор – трифторуксусная кислота (ТФУ) безводная с содержанием воды ≤0.05% и чистотой ≥99.5% (Fluka BioChemika, США). В качестве растворителей использованы вода дистиллированная; ацетонитрил ХЧ (ООО «Криохром», Россия), метанол СТХ (ООО «Экросхим», Россия), этанол ЧДА (АО «ВЕКТОН», Россия), *n*-гексан ОСЧ (ООО «Криохром», Россия). Все растворители подвергались перегонке перед применением. Для проведения ТСХ использованы пластины с силикагелем, закрепленным на алюминиевой подложке, двух типов:

1) «Kieselgel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) с толщиной слоя сорбента 210-270 мкм, с размером частиц 9.5-11.5 мкм, размером пор 60Å, с добавлением флуоресцентного индикатора, возбуждаемого при λ=254 нм;

2) «Sorbfil» ПТСХ-АФ-В высокоэффективные (ООО «ИМИД», Россия) с толщиной слоя 90-120 мкм и размером частиц 5.0-17.0 мкм.

Синтез летучих производных алкилбензолсульфонатов натрия. Рабочий раствор алкилбензолсульфоната натрия в метаноле

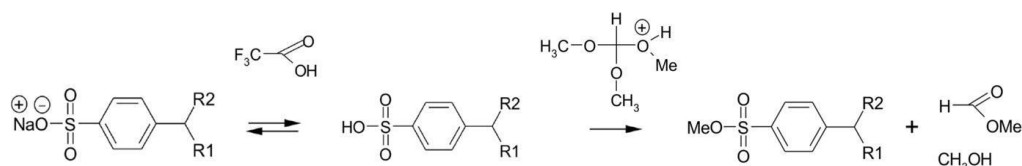


Схема 1. Схема получения метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот при обработке алкилбензолсульфонатов натрия триметилортоформиатом в присутствии безводной трифторуксусной кислоты.

Scheme 1. Scheme for the preparation of methyl esters of alkylbenzenesulphonic acids by treating sodium alkylbenzenesulphonates with trimethyl orthoformate in the presence of anhydrous trifluoroacetic acid

с концентрацией $C=10.0\pm 0.1$ мг/см³ готовили разбавлением стандартного раствора ГСО 8578-2004. Все растворы хранили без доступа света при +4°C. Метилирование алкилбензолсульфонатов натрия проводили с использованием триметилортоформиата (ТМОФ) в присутствии ТФУ (схема 1) как описано нами ранее [16]. Избыток реагентов удаляли в токе аргона при температуре термостата 90°C. Сухой остаток перерастворяли в *n*-гексане в случае анализа методом ГХ-МС или в метаноле в случае анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-УФ). Выход продуктов реакции, а именно, метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот (МЭ АБСК) 98% оценен методом ВЭЖХ-УФ на хроматографе Милихром™ А-02 (ООО «Эконова», Россия) с микроколонкой 2×75 мм, заполненной сорбентом Nucleosil 100-5 C18. Условия хроматографирования описаны ранее [16].

Оценка количественных характеристик при восходящей ТСХ. Хроматографирование алкилбензолсульфонатов натрия и их метилированных производных проводили методом восходящей ТСХ. Раствор АБСК в метаноле или раствор МЭ АБСК в *n*-гексане, либо смеси АБСК и МЭ АБСК в метаноле (10-100 мкл) наносили на стартовую линию хроматографической пластины при комнатной температуре в токе воздуха. Пластины высушивали при 40°C в течение 10 мин, охлаждали до комнатной температуры, помещали в герметичную камеру, насыщенную парами подвижной фазы в течение 20 мин в случае пластин «Sorbfil» или

без насыщения в случае пластин «Kieselgel 60 F₂₅₄». Пятна на пластинах «Kieselgel 60 F₂₅₄» визуализировали при длине волны 254 нм с использованием УФ-облучателя VILBER LOURMAT (Vilber, Франция). Визуализацию пятен на пластинах «Sorbfil» проводили с использованием йодной камеры. Измеряли и рассчитывали следующие хроматографические параметры: l (мм) – расстояние, пройденное аналитами от точки нанесения пробы до центра зоны; l_{min} и l_{max} (мм) – нижнюю и верхнюю границы зоны МЭ АБСК; L (мм) – расстояние, пройденное элюентом от линии старта до линии фронта; коэффициенты удерживания $R_f = \frac{l}{L}$; размывание зоны w (мм) в направлении движения элюента; эффективность, определяемую числом теоретических тарелок (т.т.) $N = 16 \left(\frac{l}{w}\right)^2 = 16 \left(\frac{L \cdot R_f}{w}\right)^2$ и высоту эквивалентную т.т. $H = \frac{L}{N} = \frac{w^2}{16 \cdot R_f \cdot L}$ [29].

Нисходящая ТСХ метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот. После проведения восходящей ТСХ метиловые эфиры алкилбензолсульфокислот элюировали с пластин методом нисходящей ТСХ. Для этого из пластины вырезали фрагмент, соответствующий зоне МЭ АБСК, пластину разворачивали на 90°, к верхнему краю пластины на сорбент подводили мостик из фильтровальной бумаги ~ 3×7 см («белая лента», ООО «Экротхим»). Нижний край пластины срезали под углом в 15°. Мостик помещали в чашку с элюентом. Элюирование проводили 20 см³ ацетонитрила. Элюат собирали

в сердцевидную колбу, растворитель отгоняли на роторном испарителе. Сухой остаток перерастворяли в ~ 1 см³ метанола и количественно переносили в стеклянный флакон вместимостью 1.5 см³. Растворитель отгоняли в токе аргона. Сухой остаток перерастворяли в 190 мкл *n*-гексана, добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор в *n*-гексане эйкозановой, генейкозановой и докозановой кислот с концентрациями 3.43, 1.72 и 3.47 нг/мкл соответственно при условии отсутствия данных веществ в анализируемых экстрактах) и переносили в микропробирку вместимостью 200 мкл. Анализ проводили методом ГХ-МС с ионизацией электронным ударом (ЭИ 70 эВ) с использованием хромато-масс-спектрометра «7890B GC System, 7000C GC/MS Triple Quad» (Agilent, США) с капиллярной колонкой HT8 30 м, 0.25 мм (SGE Analytical Science, Австралия). Условия анализа описаны [16].

Подготовка проб воды. Пробы природной и снеговой воды объемом ~ 1.0 дм³ и сточную воду объемом ~ 0.05 дм³ пропускали через фильтр из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0.45 мкм («Владисарт», Россия) с использованием фильтр-аппарата (Duran Group, Германия). Экстракцию АСПАВ с фильтра проводили 2 см³ этанола в ультразвуковой ванне дважды в течение 2 мин. Экстракты центрифугировали 3 мин при 13400 об/мин. Супернатант объединяли с профильтрованной пробой воды. При необходимости хранения пробы воды во время пробоотбора консервировали этанолом с концентрацией $\leq 10.0\%$. Воду пропускали через патроны «Discovery® DSC-18 SPE» с полимерно-сшитой фазой, модифицированной концевыми группами C18 (18%) (Supelco, США) в условиях вакуума от -0.05 до -1.0 МПа при скорости 30 см³/мин. Аналиты элюировали 10 см³ метанола. Растворитель отгоняли на роторном испарителе до объема ~ 0.5 см³. Экстракт количественно переносили в стеклянный флакон вместимостью 1.5 см³. Растворитель отгоняли в токе аргона. Сухой остаток метилировали ТМОФ,

перерастворяли в *n*-гексан (100 мкл), нанесли на пластины и хроматографировали методом ТСХ как описано выше.

Обсуждение результатов

Проведена восходящая ТСХ алкилбензолсульфонатов натрия и метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот на пластинах с силикагелем «Kieselgel 60 F₂₅₄» в системе апротонный : протонный растворители. Визуализация пластин в УФ при 254 нм показала, что АБС остаются на линии старта при использовании в качестве подвижной фазы смеси растворителей *n*-гексан : метанол в соотношении 23 : 1 по объему. В отличие от АБС (рис. 1, зоны «1») их метилированные производные (20 изомеров, принадлежащих к четырем гомологическим группам C10-C13) перемещаются на пластинах с силикагелем разными типами подвижных фаз, образуя общую для всех гомологических групп симметричную зону (рис. 1, зоны «2»). Изомеры и гомологи не разделяются в указанных условиях. Аналогично ведут себя указанные соединения на пластинах «Sorbfil». Концентрация суммы аналитов в пробе свидетеля, достаточная для визуализации в УФ, составляет 25-200 мкг.

Для зон МЭ АБСК установлены средние значения коэффициентов удерживания ($n=16$) на пластинах «Kieselgel 60 F₂₅₄» ($R_f=0.62$) и «Sorbfil» ($R_f=0.71$) с повторяемостью, характеризующейся значениями относительного стандартного отклонения (ОСО) 0.04 для обоих типов пластин и среднеквадратичного отклонения (СКО) 6.1 и 5.9% соответственно (табл.). Из таблицы видно, что эффективность разделения *N* на пластинах «Sorbfil» (~ 700 т.т.) почти вдвое выше, чем на пластинах «Kieselgel 60 F₂₅₄». Тем не менее, пластины «Kieselgel 60 F₂₅₄» обладают рядом преимуществ, обеспечивая более простую и быструю подготовку проб. Это связано с их меньшей чувствительностью к изменению внешних условий, относительной влажности. Пластины «Kieselgel 60 F₂₅₄» не требуют предварительного насыщения ка

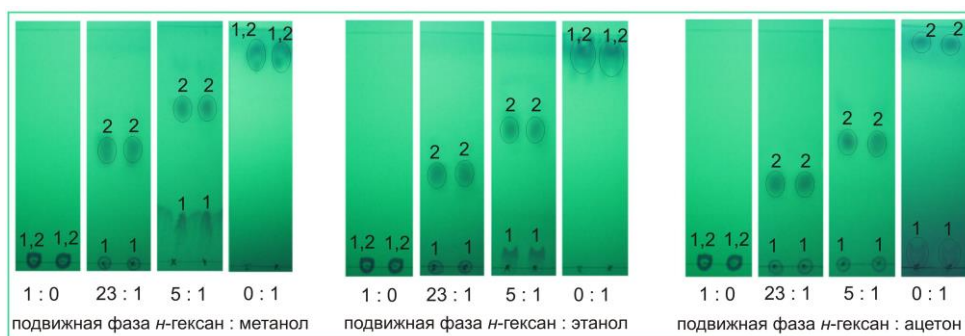


Рис. 1. Восходящая ТСХ алкилбензолсульфонатов натрия (зоны «1») и метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот (зоны «2») на пластинах «Kieselgel 60 F₂₅₄». Подвижная фаза – смесь *n*-гексана с протонными растворителями. Каждая проба нанесена на пластину в двух повторностях ($n=2$). Визуализация в УФ при 254 нм.

Fig. 1. Ascending TLC of sodium alkylbenzenesulphonates (zones “1”) and methyl esters of alkylbenzenesulphonic acids (zones “2”) on Kieselgel 60 F₂₅₄ plates. Mobile phase – mixture of *n*-hexane with protic solvents. Each sample was applied to the plate in duplicate ($n=2$). Manifested under UV at 254 nm.

Таблица 1. Качественные и количественные характеристики, полученные при тонкослойной хроматографии метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот
 Table 1. Qualitative and quantitative characteristics obtained by thin layer chromatography of methyl esters of alkylbenzenesulphonic acids

Параметр (среднее значение, $n = 16$)	Тип пластины	
	«Kieselgel 60 F ₂₅₄ »	«Sorbfil»
L , мм	70.0	60.0
l , мм	42.8	42.4
l_{min} , мм	34.0	35.0
l_{max} , мм	52.5	51.0
w , мм	8.88	6.48
$R_f \pm \Delta$, $P=0.95$	0.62 ± 0.2	0.71 ± 0.2
ОСО оценки R_f	0.04	0.04
СКО оценки R_f , %	6.07	5.87
N , т.т.	~ 400	~ 700
H , мм	0.183	0.087
t , мин	10	10-30
V_r , % ($m=20, n=2$)	0.6	2.3

меры парами растворителя, имеют однородный слой сорбента по всей пластине в отличие от бороздчатой структуры слоя на пластинах «Sorbfil», обеспечивая ровную линию фронта подвижной фазы по всей ширине пластины. Так повторяемость оценки R_f двух параллельных проб на одной пластине оценена значениями коэффициентов вариации V_r 0.6 и 2.4% для «Kieselgel 60 F₂₅₄» и «Sorbfil» соответственно. Время хроматографирования t на пластинах «Sorbfil» варьируется в зависимости от степени насыщения камеры (табл.).

С использованием метода ГХ-МС показано, что нисходящая ТСХ ацетонитрилом обеспечивает количественное (95.0-100.0 %, $n=6$) элюирование зоны метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот с пластин. На рисунке (рис. 2) представлены масс-хроматограммы (m/z 199) раствора МЭ АБСК до проведения ТСХ (суммарное содержание аналитов в пробе 1.53 ± 0.02 мкг) и после (1.57 ± 0.08 мкг, $n=6$). Показано, что экстракция аналитов с пластин ацетонитрилом, метанолом, этанолом, ацетоном при облучении ультразвуком или при нагревании до

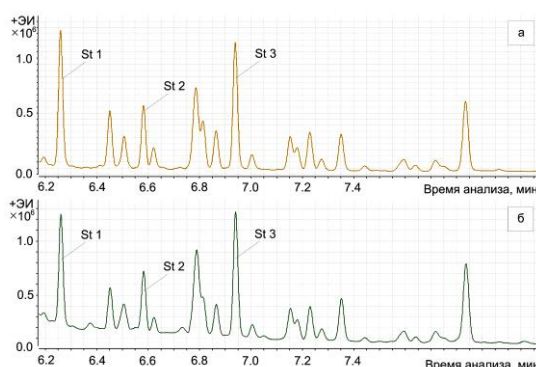


Рис. 2. Масс-хроматограммы (m/z 199) стандартной смеси метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот, полученные на хромато-масс-спектрометре «6890В GC System / 7000С GC/MS Triple Quad» с колонкой HT8 30 м: а – до проведения ТСХ; б – после восходящей и нисходящей ТСХ на пластине «Kieselgel 60 F₂₅₄». В качестве хроматографических стандартов использованы метиловые эфиры эйкозановой (St 1), генэйкозановой (St 2) и докозановой (St 3) кислот. Концентрация суммы АБС в анализируемых пробах – 7.65 мкг/см³. Масса АБС, введенных в инжектор – 22.95 нг.

Fig. 2 Mass chromatograms (m/z 199) of standard mixture of methyl esters of alkylbenzenesulphonic acids, obtained using a gas chromatograph coupled to mass-spectrometer 6890В GC System, 7000С GC/MS Triple Quad with an HT8 30 m column: a – before TLC; b – after ascending and descending TLC on a Kieselgel 60 F₂₅₄ plate. Methyl esters of eicosanoic (St 1), heneicosanoic (St 2), and docosanoic (St 3) acids were used as chromatographic standards. The concentration of the total linear alkylbenzenesulfonates (LAS) in the analysed samples was

температуры кипения растворителя обеспечивает десорбцию аналитов ~25-70%. Это объясняется микропористой структурой сорбента. Элюирование метанолом и этанолом дает плохие результаты в связи с их меньшей (до трех и до восьми раз) подвижностью по сравнению с MeCN.

Поведение метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот на пластинках «Kieselgel 60 F₂₅₄» (Merck) и «Sorbfil» (ИМИД) позволило использовать метод ТСХ для доочистки экстрактов проб воды. Первая стадия очистки реальных проб происходит параллельно с концентрированием алкилбензолсульфонатов из воды на патронах с обращено-фазным сорбентом «Discovery® DSC-18 SPE». Для исключения систематической погрешности при фиксации проб воды этанолом было предварительно приготовлено 6 растворов АБС (С 200 мкг/дм³) в дистиллированной воде объемом 1.0 дм³ с содержанием этанола 0.0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 и 10.0%. Каждый раствор готовили в восьми повторностях ($m=24, n=8$). Растворы (по две параллельных пробы каждого) пропускали через

патроны с сорбентом со скоростью 10, 15, 25 и 30 см³/мин. Анализ методом ВЭЖХ-УФ показал, что АБС полностью удерживаются сорбентом из водно-спиртовых растворов и могут быть количественно элюированы метанолом (100±3%). Вторая стадия очистки заключается в селективной экстракции неполярных и слабополярных веществ при перерастворении метилированных экстрактов воды в *n*-гексан. Результаты, полученные при проведении ТСХ гексановых экстрактов (третья стадия очистки) представлены на рисунке (рис. 3).

Из рисунка 3 видно, что очистка методом ТСХ позволяет выделять фракцию МЭ АБСК, очищенную как от пигментированных компонентов пробы, которые можно определить невооруженным глазом (рис. 3 Г, Е, З), так и от большей части примесей, видимых в УФ-области (рис. 3, Д, Ж, И). На рисунке (рис. 4) в качестве примера представлены масс-хроматограммы гомологов С10-С13 метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот, идентифицированных в пробе сточной воды, а также гомологов

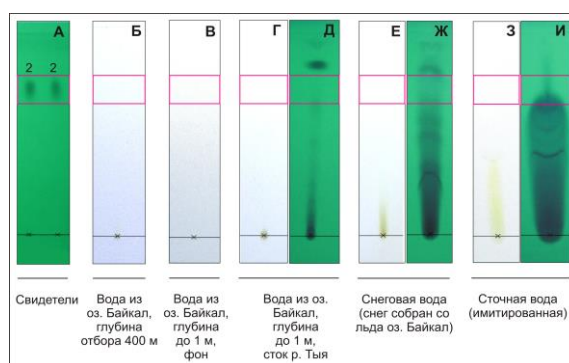


Рис. 3. Восходящая ТСХ на пластинах «Kieselgel 60 F₂₅₄» метилированных экстрактов проб воды из оз. Байкал, отобранной батометром на центральной станции разреза р. Солзан – ст. Маритуй с глубины 400 м (Б) и с глубины 0.0–1.0 м (В); поверхностной воды из оз. Байкал, отобранной в районе впадения в озеро реки Тья (Г, Д); снеговой воды (снег отобран в районе пос. Байкал со льда озера) (Е, Ж); имитированной неочищенной сточной воды (З, И). Визуализация в видимой области спектра (Б, В, Г, Е, З) и в УФ при 254 нм (А, Д, Ж, И). Раствор свидетеля (А, зона «2»). Розовым выделены области, соответствующие зоне метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот.

Fig. 3 Ascending TLC of methylated extracts of water samples on Kieselgel 60 F₂₅₄ plates: Lake Baikal water sampled from with a bathometer at the central station of the transect of Solzan River – Marituy railway station from a depth of 400 m (B) and from a depth of 0.0–1.0 m (C); surface water from Lake Baikal, sampled in the area where the Tyya River flows into the lake (D, E); snow water (snow collected in the area of the village of Baikal from the ice of the Lake Baikal) (F, G); simulated untreated wastewater (H, I). Visualisation in the visible region of the spectrum (B, C, D, F, H) and in the UV at 254 nm (A, E, G, I). Tracking solution (A, zone “2”).

The areas corresponding to the zone of methyl esters of alkylbenzenesulphonic acids are highlighted in pink.

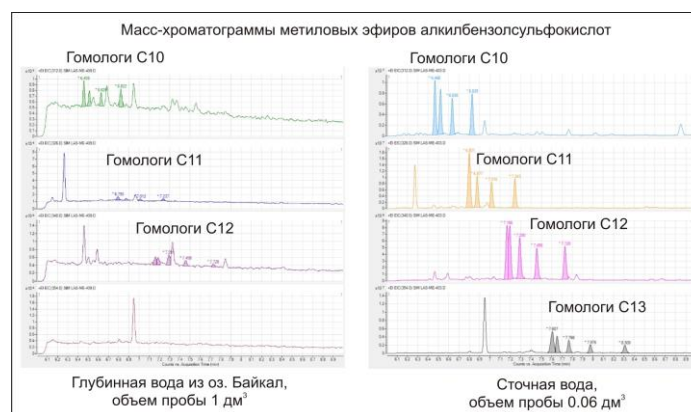


Рис. 4. Масс-хроматограммы гомологов (пики выделены) метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот с длиной алкильной цепи C10 (m/z 312), C11 (m/z 326), C12 (m/z 340), C13 (m/z 354), идентифицированные в пробах глубинной воды оз. Байкал (глубина отбора 400 м) и сточной воды. Объем анализируемых проб – 1 см³. Объем пробы, вводимой в инжектор – 3 мкл. Хроматограммы получены на хромато-масс-спектрометре «6890B GC System / 7000C GC/MS Triple Quad» с колонкой HT8 30 м, 0.25 мм.

Fig. 4. Mass chromatograms of homologues (peaks highlighted) of methyl esters of alkylbenzenesulphonic acids with a C10 alkyl chain length (m/z 312), C11 (m/z 326), C12 (m/z 340), C13 (m/z 354), identified in samples of deep water from Lake Baikal (sampling depth was 400 m) and waste water. The volume of analysed extracts was 1 cm³. The sample volume injected into the injector was 3 μl. Chromatograms were obtained using a 6890B GC System / 7000C GC/MS Triple Quad gas chromatograph coupled to mass spectrometer with an HT8 30 m, 0.25 mm column.

C10-C12, идентифицированных в пробе отобранной в южной котловине озера Байкал на центральной пелагической станции
 глубинной воды (глубина отбора 400 м),



разреза от поселка Солзан на восточном побережье до села Маритуй на западном. В сточной воде идентифицировано 18 пиков метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот, а в пробе глубинной воды – 13 пиков. Отмечено, что содержание гомологов C13 в глубинной воде оз. Байкал ниже пределов обнаружения, содержание отдельных изомеров, отнесенных к гомологическим группам C11-C12 ниже пределов их определения, суммарное содержание гомологов C10 оценено значением 0.24 ± 0.02 мкг/дм³. Концентрация АБС в воде, полученной при таянии снега, отобранного со льда р. Крестовка в месте впадения ее в оз. Байкал (район пос. Листвянка, N 51°51.3', E 104°51.5', время отбора февраль 2023 г.) оценена значением 31.1 ± 1.0 мкг/дм³. Внутрилабораторная прецизионность определения гомологов C10 охарактеризована коэффициентом вариации $V=7.6\%$ ($m=33, n=2$).

Список литературы/References

1. Britton L.N. Surfactants and the environment. *J. of Surfactants and Detergents*, 1998; 1(1): 109-117. <https://doi.org/10.1007/s11743-998-0014-6>.
2. Moldovan Z., Avram V., Marincas O., Petrov P., Ternes T. The determination of the linear alkylbenzene sulfonate isomers in water samples by gas-chromatography/mass spectrometry. *J. of Chromatography A*, 2011; 1218(2): 343-349. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.043>
3. LAS. Linear Alkylbenzene Sulphonate (CAS No. 68411-30-3). Revised Environmental Aspect of the HERA Report, February 2013. P. 1-55.
4. Linear alkylbenzene sulfonates. SIDS Initial Assessment Report for 20th SIAM. UNEP Publications, Paris, France, 19-21 April, 2005. P. 1-357.
5. Приказ № 83 от 21.02.2020 “Об утверждении нормативов предельно допустимых воздействий на уникальную экологическую систему озера Байкал и

Заключение

Установлены значения коэффициентов удерживания $R_f=0.62$ и $R_f=0.71$ зон метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот на пластинах «Kieselgel 60» (Merck, Германия) и «Sorbfil» (ИМИД, Россия) соответственно при использовании в качестве подвижной фазы смеси растворителей гексан : метанол 23 : 1 (по объему). На примере реальных проб природной, снеговой и сточной воды показана возможность использования указанных пластин в анализе АСПАВ для выделения и концентрирования узкой фракции метиловых эфиров алкилбензолсульфокислот методом восходящей ТСХ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

perechnya vrednykh veshchestv, v tom chisle veshchestv, odnosyashchikhsya k kategoriyam osobo opasnykh, vysokopasnykh, opasnykh i umerenno-opasnykh, dlya unikalnoi ekologicheskoi systemy ozera Baikal” [The Order No. 83 from 21.02.2020 “On the statement of the standards of maximum permissible effects on Lake Baikal unique ecological system and the list of hazardous substances including extremely-hazardous, high-hazardous, hazardous, and moderate-hazardous substances for Lake Baikal unique ecological system]. The Ministry of Natural Resources and Ecology of Russian Federation. (In Russ.)

6. Приказ № 552 от 13.12.2016 “Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения” с изменениями от 10.03.2020 [The Order No. 552 from 13.12.2016 “On the statement of the stand-



ards of water quality of fisheries water bodies including maximum permissible concentration of toxic substances in fisheries water bodies” including corrections from 10.03.2020]. The Ministry of Agriculture of Russian Federation. Зарегистрировано в МИНЮст РФ 13.01.2017 г., рег. № 45203. (In Russ.)

7. Nikonova A.A., Mizandrontsev I.B., Bazhenov B.N. et al., Khanaev I.V., Shabalina O.V., Afanasyeva A.A., Avezova T.N., Chindyavskaya A.N., Bityutsky A.N., Kan A.Y., Karikh L.G., Dubrova K.S., Vorobyeva S.S., Glyzina O.Y. Toxic effect of anionic surfactants on freshwater sponge *Lubomirskia baikalensis* and its endosymbiotic microalgae *Chlorella* sp. *Diversity*, 2023; 15: 77. <https://doi.org/10.3390/d15010077>.

8. Belanger S.E., Bowling J.W., Lee D.M., Le Blank E.M., Kerr K.M., McAvoy D.C., Christman S.C., Davidson D.H. Integration of aquatic fate and ecological responses to linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in model stream ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002; 52: 150-171. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2179>.

9. Lewis A.M. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Wat. Res.*, 1991; 25(1): 101-113. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90105-Y](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90105-Y).

10. Gouda A.M.R., Hagraas A.E., Okbah M.A., El-Gammal M.I. Influence of the linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on hematological and biochemical parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2022; 29: 1006-1013. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.074>

11. Jorgensen E., Christoffersen K. Short-term effects of linear alkylbenzene sulfonate on freshwater plankton studied under field conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2000; 19(4): 904-911. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190417>

12. Nikonova A.A., Vorobyeva S.S. Nonspecific response of Lake Baikal phytoplankton to anthropogenic impact. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2022, 26: 467-476. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-57>

13. Zhou J., Wu Z., Yu D., Pang Y., Cai H., Liu Y. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate to aquatic plant *Potamogeton perfoliatus* L. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2018; 25(32): 32303-32311. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3204-7>

14. Preethi P.S., Hariharan N.M., Vickram S., Rameshpathy M., Manikandan S., Subbaiya R., Karmegam N., Yadav V., Ravindran B., Chang S.W., Awasthi M.K. Advances in bioremediation of emerging contaminants from industrial wastewater by oxidoreductase enzymes. *Bioresource Technology*, 2022; 359: 127444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127444>

15. Bradai M., Han J., El Omri A., Funamizu N., Sayadi S., Isoda H. Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on human intestinal Caco-2 cells at non cytotoxic concentrations. *Cytotechnology*, 2016; 68(4): 1267-1275. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9887-4>

16. Nikonova A.A., Proidakov A.G., Rokhin A.V., Chindyavskaya A.N., Dylgerova S.D., Rokhina E.F., Khanaev I.V. Efficient and green esterification approach for determining of sodium alkylbenzene sulfonates in dry extracts. *Talanta Open*, 2023; 8: 100238. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2023.100238>

17. DIONEX. Application Note 219. Determination of linear alkylbenzene sulphate in treatment plant wastewater streams using on-line solid-phase extraction followed by HPLC with fluorescence detection. Available at: <http://www.cromlab.es/Articulos/Columnas/HPLC/Thermo/Account/SURF/81963-AN219-LC-LAS-Surfactant-05Oct2009-LPN2152.pdf> по состоянию на 18.08.2023 (accessed 25.08.2023). (In Russ.)



18. Ding W.H., Chen C.T. Analysis of linear alkylbenzene sulfonates in water samples by large-volume injection-port derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1999; 857: 359-364. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00722-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00722-0)
19. Ding W.H., Lo J.-H., Tzing S.-H. Determination of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation products in water samples by gas chromatography with ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1998; 818: 270-279. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00550-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00550-0)
20. Waters J., Garrigan J.T. An improved microdesulphonation/gas liquid chromatography procedure for the determination of linear alkylbenzene sulphonates in U.K. rivers. *Water Res.*, 1983; 17: 1549-1562. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90011-8)
21. Reemtsma T. Methods of analysis of polar aromatic sulfonates from aquatic environments. *Journal of Chromatography A*, 1996; 733: 473-489. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00738-5](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00738-5)
22. Guo P., Guan Z., Wang W., Chen B., Huang Yu. Determination of linear alkylbenzene sulfonates by ion-pair solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 2011; 84(2): 587-92. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.014>
23. Kirchner J.G. Thin layer chromatography. New York – Chichester – Brisbane – Toronto, John Wiley & Sons, Inc., 1978, 788 p.
24. Bhawani S.A., Sulaiman O., Hashim R., Mohamad Ibrahim M.N. Analysis of surfactants by thin-layer chromatography: A Review. *Tenside Surf. Det.*, 2011; 47(2): 73-80. <https://doi.org/10.3139/113.110054>
25. Voogt P., Knepper T.P. Quantification and quality assurance in surfactant analysis. Chapter 4. In: *Comprehensive Analytical Chemistry XL*. Eds by Knepper T.P., Barcelo D., and Voogt P. Elsevier Science B.V. 2003. P. 443-523. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(03\)40007-X](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(03)40007-X)
26. Dyer S.D., Bernhard M.J., Cowan-Ellsberry C., Perdu-Durand E., Demmerle S., Cravedi J.-P. *In vitro* biotransformation of surfactants in fish. Part I: Linear alkylbenzene sulfonate (C12-LAS) and alcohol ethoxylate (C13EO8). *Chemosphere*. 2008; 72: 850-862. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.019>
27. Claben D., Ackermann J., Schaeffer A. Fate and behavior of ¹⁴C-labelled ionic compounds in a soil simulation test. *Science of the Total Environment*. 2021; 768: 144970. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.144970>
28. Lawrence J.G. Chapter III. Surfactants. Chromatography. In: *Encyclopedia of separation science*. Ed. by Wilson I.D. Academic Press, 2000: 4310-4327.
29. Stauffer E., Dolan J.A., Newman R. Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*, 2008: 235-293. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>

Информация об авторах / Information about the authors

А.А. Никонова – гл. специалист по хромато-масс-спектрометрии лаб. хроматографии, к.х.н., Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

Е.Ф. Рохина – доцент кафедры теоретической и прикладной органической химии и полимеризационных процессов, к.х.н., Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

A.A. Nikonova – Chief Specialist in chromatography-mass spectrometry of the Laboratory of Chromatography, Dr. of Sci. (Chemistry), Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia, E-mail: alenaxis@list.ru

E.F. Rokhina – Associate Professor of the Department of Theoretical and Applied Organic Chemistry and Polymerization Processes, Dr. of Sci. (Chemistry), Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, e-mail: lady.rokhina2017@yandex.ru



О.Ю. Глызина – рук. группы экспериментальной гидробиологии, с.н.с., к.б.н., Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

С.Д. Дылгерова – студент химического факультета Иркутского государственного университета и практикант в лаборатории хроматографии Лимнологического института СО РАН, Иркутск, Россия

А.Н. Чиндявская – студент химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (г. Москва) и практикант в лаборатории хроматографии Лимнологического института СО РАН, Иркутск, Россия

А.В. Рохин – профессор кафедры теоретической и прикладной органической химии и полимеризационных процессов, д.х.н., Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

А.Г. Пройдаков – профессор кафедры теоретической и прикладной органической химии и полимеризационных процессов, д.х.н., Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

O.Yu. Glyzina – Head of the Team of Experimental Hydrobiology, Senior Researcher, Dr. of Sci. (Biology), Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia,

S.D. Dylgerova – student of the Faculty of Chemistry of Irkutsk State University and intern in the Laboratory of Chromatography of the Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

A.N. Chindyavskaya – student of the Faculty of Chemistry of Irkutsk State University and intern in the Laboratory of Chromatography of the Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

A.V. Rokhin – Prof. of the Department of Theoretical and Applied Organic Chemistry and Polymerization Processes, Dr. of Sci. (Chemistry), Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

A.G. Proidakov – Prof. of the Department of Theoretical and Applied Organic Chemistry and Polymerization Processes, Dr. of Sci. (Chemistry), Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Статья поступила в редакцию 01.09.2023; одобрена после рецензирования 03.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 01.09.2023; approved after reviewing 03.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 54.057:543.421.424:544.723.23

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12139

Диффузионная и химическая кинетика адсорбции метиленового голубого на кремнеземах, допированных ионами железа (III)

Евгений Николаевич Титов^{1,2},

Дмитрий Евгеньевич Смальченко¹, Ольга Евгеньевна Лебедева¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, olebedeva@bsu.edu.ru

²Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия

Аннотация. Кремнеземы находят широкое применение в катализе, адсорбции, хроматографии. В последнее десятилетие растет их использование в медицине, однако для обеспечения биосовместимости необходимо модифицирование кремнезёмов, простейшим вариантом которого является допирование катионами железа. В статье представлено исследование сорбционных характеристик кремнезёмов, допированных катионами железа. Целью исследования являлась оценка влияния допирования ионами железа на кинетику адсорбции кремнеземами модельного сорбата метиленового голубого. Допированные кремнеземы синтезированы алкоксидным золь-гель методом при pH=1.5 и pH=5.0 с введением катионов железа в реакционную смесь в ходе гидролиза тетраэтоксисилана. Содержание железа в образцах составило 1.5, 2.3 и 3.8 атомных процентов. По результатам рентгенофазового анализа все образцы рентгеноаморфны. По форме изотерм низкотемпературной адсорбции азота все образцы отнесены к микропористым. Площадь удельной поверхности образцов и общий объем пор несколько снижаются с ростом содержания железа в образцах. Адсорбция метиленового голубого производилась при температуре 25, 30 и 35°C. Кинетические кривые адсорбции проанализированы при помощи моделей диффузионной кинетики: модели Бойда (внешнедиффузионный процесс) и модели Морриса-Вебера (внутридиффузионный процесс). Также данные кинетических исследований были проанализированы с использованием кинетических моделей псевдопервого порядка (модель Лагергрена) и псевдвторого порядка (модель Хо и Маккея). Установлено, что все образцы характеризуются смешаннодиффузионным течением сорбционного процесса. Кинетику адсорбции адекватно описывает модель псевдвторого порядка.

Ключевые слова: золь-гель, кремнезем, адсорбция, метиленовый голубой, смешаннодиффузионный режим, кинетика псевдвторого порядка.

Для цитирования: Титов Е.Н., Смальченко Д.Е., Лебедева О.Е. Диффузионная и химическая кинетика адсорбции метиленового голубого на кремнеземах, допированных ионами железа (III) // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 2. С. 281-288. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12139>

Original article

Diffusion and chemical kinetics of methylene blue dye adsorption on silica doped with iron (III) ions

Evgeniy N. Titov^{1,2}, Dmitriy E. Smalchenko¹, Olga E. Lebedeva¹

¹Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

²All-Russian Research Institute of the Dairy Industry, Moscow, Russia, olebedeva@bsu.edu.ru

Abstract. Silica are widely used in catalysis, adsorption, and chromatography. In the last decade, they have been increasingly used in medicine, however, to ensure their biocompatibility, silica need to be modified and the simplest way of such a modification is doping them with iron cations. The article presents a study of the

sorption characteristics of silica doped with iron cations. The purpose of the study was to assess the effect of doping silica with iron ions on the kinetics of their adsorption of model sorbate of methylene blue dye. Doped silica were synthesised by the alkoxide sol-gel method at pH=1.5 and pH=5.0 with the introduction of iron cations into the reaction mixture during the hydrolysis of tetraethoxysilane. The iron content in the samples was 1.5, 2.3, and 3.8 at. %. According to the results of X-ray phase analysis, all samples were X-ray amorphous. According to the shape of the isotherms of low-temperature nitrogen adsorption, all samples were classified as microporous. The specific surface area of the samples and the total pore volume decreased slightly with an increase in the iron content in the samples. The adsorption of methylene blue dye was carried out at temperatures of 25, 30, and 35 °C. The kinetic adsorption curves were analysed using the following diffusion kinetics models: Boyd model (external diffusion process) and Weber-Morris model (internal diffusion process). Also, the kinetic data were analysed using kinetic models of pseudo first-order (Lagergren model) and pseudo second-order (Ho and McKay's model). It was established that all samples were characterised by a mixed-diffusion regime of the sorption process. Adsorption kinetics was adequately described by the model of pseudo-second-order.

Keywords: sol-gel, silica, adsorption, methylene blue dye, mixed diffusion regime, kinetics of pseudo-second-order.

For citation: Titov E.N., Smalchenko D.E., Lebedeva O.E. Diffusion and chemical kinetics of methylene blue dye adsorption on silica doped with iron (III) ions. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 281-288. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12139>

Введение

Кремнеземы находят широкое применение благодаря сочетанию таких свойств как развитая поверхность, высокая пористость, низкая плотность, разнообразие способов получения и модифицирования, нетоксичность, термическая стабильность. Перечисленные свойства лежат в основе использования кремнезёмов в катализе [1,2], сорбции [3,4], хроматографии [5,6]. Новые возможности открылись с появлением и развитием золь-гель метода в различных вариантах: в последние годы привлекают широкое внимание наночастицы оксида кремния [7], аэрогели [8], упорядоченные мезопористые кремнеземы [9,10] и другие разновидности материалов на основе оксида кремния. Синтез ксерогелей алкокксидным золь-гель методом достаточно прост: он включает стадии гидролиза алкокксида, поликонденсацию продуктов гидролиза и последующее прокалывание [11].

Кремнеземы рассматриваются как весьма перспективные биоматериалы для таргетной доставки лекарственных средств в организме и контрастирования изображений в современных методах диагностики, поскольку кремнеземы обладают биосовместимостью, гидрофильно-

стью и способностью длительно циркулировать в крови [12]. Тем не менее, остаются некоторые опасения последствий возможного накопления этих материалов в организме, и продолжается поиск способов их модифицирования для повышения биосовместимости. Установлено, что допирование силикагелей ионами железа (III) повышает способность материалов к биodeградации [13]. В связи с этим изучение сорбционных свойств кремнезёмов, допированных ионами железа, представляет интерес для оценки применимости данных материалов для адресной доставки лекарств. Эта функция требует высокой поглотительной способности и возможности постепенного высвобождения сорбата, то есть необходимо контролировать кинетику адсорбции. Оптимальным является допант, регулирующий способность материала к биodeградации, но при этом не ухудшающий его сорбционные характеристики.

Целью настоящей работы являлась оценка влияния допирования ионами железа кремнезёмов, полученных золь-гель методом в различных условиях, на кинетику адсорбции модельного сорбата метиленового голубого.

Известны работы по исследованию свойств железосодержащих кремнезёмов, полученных другими методами. Так,



в [14] подробно охарактеризованы образцы, синтезированные методами пропитки кремнезема солью железа и осаждения из паровой фазы. Авторы отмечают, что при низком содержании железа (1 масс.%) формируются материалы, содержащие преимущественно изолированные ионы железа. С увеличением содержания железа проявляется взаимодействие ионов железа с подложкой, формируется новая фаза, снижается площадь удельной поверхности образца. Размеры поверхности также зависят от метода приготовления образцов. Осаждение хлорида железа из паровой фазы приводит к наиболее заметному снижению площади удельной поверхности. Представляла интерес оценка поведения кремнеземов, допированных ионами железа непосредственно в процессе синтеза, поскольку в этом случае достигается наиболее равномерное распределение допанта по образцу и, как следствие, минимальное влияние на сорбционные характеристики материалов.

Экспериментальная часть

Кремнеземы получали гидролизом тетраэтоксисилана (ТЭОС) квалификации «о.с.ч.» в присутствии ионов железа, источником которых служил нонагидрат нитрата железа квалификации «х.ч.». Процесс осуществляли в водно-спиртовом растворе. Для получения всех образцов основные компоненты смешивали в мольном соотношении ТЭОС : этанол : вода, составляющем 1 : 4 : 16. Соль железа добавляли в реакционную смесь с таким расчетом, чтобы в конечном сухом легированном кремнеземе содержание железа составляло 1.5, 2.3 или 3.8 ат. %. Синтез проводили при двух различных значениях рН: 1.5 и 5.0, которые поддерживали добавлением 1М раствора аммиака для образцов с рН=5.0, либо добавлением 0.01М раствора азотной кислоты для образца с рН=1.5. При достижении необходимого значения рН образцы в течение 1 ч перемешивали на магнитной

мешалке (500 об/мин) и помещали в термостат при температуре 50°C до окончания процессов поликонденсации (до момента перехода золя в гель). Старение образцов осуществляли при 85°C в течение 12 ч с последующим прокаливанием при 500°C (скорость нагрева 10°C/мин) в течение 3 ч.

Рентгенофазовый анализ выполняли с использованием рентгеновского порошкового дифрактометра SmartLab – Rigaku (CuK α – излучение). Текстуальные характеристики (площадь удельной поверхности, общий объем пор, распределение пор по размерам) определяли методом низкотемпературной адсорбции-термодесорбции азота на анализаторе удельной поверхности и пористости TriStar 3020 при температуре 77 К.

Для определения кинетических характеристик адсорбции в качестве сорбата использовали краситель метиленовый голубой. Эксперименты проводили при 25, 30 и 35°C в течение 240 минут. Значения рН исходного раствора метиленового голубого составляло 6.64; после окончания кинетических экспериментов рН растворов лежали в диапазоне 5.40-5.90. Исследования выполняли в режиме ограниченного объема. Концентрацию красителя в растворе определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Specord 210 PLUS (Analytic Jena) при максимуме поглощения 665 нм. Положение максимума не изменялось в ходе эксперимента и свидетельствовало о мономерной форме метиленового голубого в растворе. Полученные кинетические кривые были проанализированы при помощи моделей диффузионной кинетики: модели Бойда (внешнедиффузионный процесс) [16] и модели Морриса-Вебера (внутридиффузионный процесс) [17]. Также данные кинетических исследований были проанализированы с использованием кинетических моделей псевдопервого (модель Лагергрена [18]) и псевдовторого (модель Хо и Маккея [19]) порядков.

Таблица 1. Состав и текстурные свойства кремнезёмов, допированных ионами железа
 Table 1. Composition and textural properties of silicas doped with ferric ions

№	pH гидролиза	Содержание железа, ат.%	Площадь удельной поверхности, м ² /г	Объем пор, см ³ /г	Диапазон диаметров пор, нм
1	1.5	1.5	590	0.32	1.8-5.0
2		2.3	586	0.22	1.8-5.0
3		3.8	437	0.21	1.8-5.0
4	5.0	1.5	541	0.34	1.8-80.0
5		2.3	432	0.19	1.8-60.0
6		3.8	386	0.16	1.8-50.0

Обсуждение результатов

Общая характеристика синтезированных образцов легированных кремнезёмов представлена в таблице 1. Далее в тексте нумерация образцов сохраняется. Согласно данным РФА, все образцы рентгеноаморфны. Изотермы низкотемпературной адсорбции азота для всех изучаемых образцов однотипны. Они относятся к I типу по классификации ИЮПАК, характерному для микропористых сорбентов. Можно видеть, что повышение содержания железа в образцах приводит к некоторому снижению площади удельной поверхности и объема пор легированных кремнезёмов (табл. 1). Отсутствие рефлексов соединений железа на рентгеновских дифрактограммах свидетельствует, что крупные агломераты, сужающие либо блокирующие поры кремнезёмов, не сформировались. Однако нельзя исключать присутствие наноразмерных рентгеноаморфных частиц оксида железа или его гидрата. Можно было ожидать, что это найдет отражение в развитии внутридиффузионных ограничений, особенно для молекул большего размера, чем молекула азота. В качестве такого сорбата использовали метиленовый голубой.

Особенностью метиленового голубого является разнообразие форм его нахождения в растворах, обусловленное участием в различных протолитических и окислительно-восстановительных процессах [15]. Поскольку адсорбционные

эксперименты проводились при значении pH, близком к нейтральному, в отсутствие восстановителей в системе, исходили из предположения о преобладании в растворе метиленового голубого в его таутомерных окисленных формах. Эти формы положительно заряжены, что практически исключает их избирательную адсорбцию на катионах железа, инкорпорированных в кремний-кислородную трехмерную сетку.

Кинетические кривые адсорбции метиленового голубого получали при начальной концентрации сорбата в растворе 0.03 ммоль/дм³. Эксперимент провели для трех различных значений температуры. Примеры кинетических кривых поглощения метиленового голубого допированными кремнезёмами при 25°C приведены на рис. 1. В рамках моделей диффузионной кинетики были построены зависимости $-\ln(1-F) = f(t)$ и $F = f(t^{1/2})$, где F – степень завершения процесса, рассчитываемая по формуле

$$F = a_t/a_e,$$

где a_e и a_t – количество сорбированного красителя на единицу массы сорбента в состоянии равновесия и в момент времени t. Известно, что в случае преобладания внешнедиффузионного лимитирования процесса сорбции линейной является первая из приведенных зависимостей. Если лимитирующей стадией сорбции является внутренняя диффузия, то наблюдается линейная корреляция во втором случае [16, 17]. В нашем случае удовлетворительные коэффициенты линейной

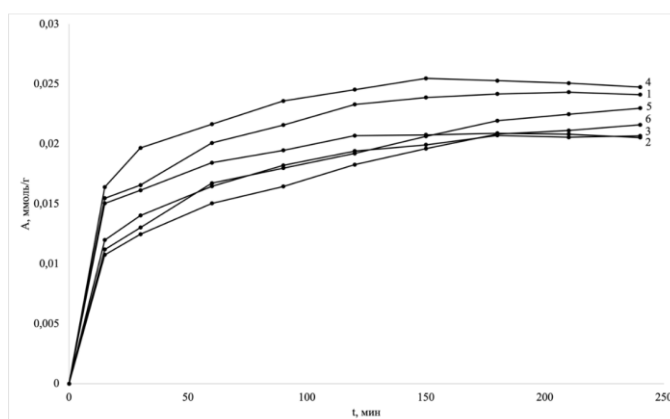


Рис. 1. Кинетические кривые поглощения метиленового голубого из водного раствора кремнеземами, допированными ионами железа, при температуре 25°C.

Fig. 1. Kinetic curves of methylene blue dye adsorption from an aqueous solution by silica doped with iron ions at a temperature of 25°C.

Таблица 2. Результаты анализа кинетических кривых адсорбции метиленового голубого методами диффузионной и химической кинетики

Table 2. Results of analysis of kinetic curves of methylene blue sorption by methods of diffusion and chemical kinetics

Образец	t, °C	Внутренняя диффузия	Внешняя диффузия	Модель псевдопервого порядка		Модель псевдовторого порядка		
		R ²	R ²	k, мин ⁻¹	R ²	A _{max} , ммоль·г ⁻¹	k, г·ммоль ⁻¹ ·мин ⁻¹	R ²
1	25	0.95	0.95	0.03	0.95	0.02	5.79	0.99
	30	0.98	0.90	0.03	0.98	0.02	6.56	0.99
	35	0.97	0.95	0.03	0.97	0.02	6.81	0.99
2	25	0.97	0.95	0.02	0.97	0.02	2.68	0.99
	30	0.95	0.97	0.03	0.95	0.02	4.90	0.99
	35	0.94	0.94	0.03	0.94	0.02	5.09	0.99
3	25	0.99	0.98	0.02	0.99	0.02	2.61	0.99
	30	0.91	0.96	0.03	0.92	0.02	2.82	0.99
	35	0.81	0.90	0.03	0.81	0.02	3.12	0.99
4	25	0.99	0.96	0.02	0.99	0.02	4.12	0.99
	30	0.98	0.87	0.02	0.97	0.02	5.07	0.99
	35	0.99	0.96	0.02	0.99	0.02	5.79	0.99
5	25	0.96	0.99	0.02	0.96	0.02	1.38	0.99
	30	0.93	0.96	0.02	0.93	0.02	1.55	0.99
	35	0.92	0.99	0.02	0.92	0.02	1.71	0.99
6	25	0.95	0.98	0.02	0.95	0.02	1.35	0.99
	30	0.85	0.99	0.02	0.85	0.02	1.48	0.99
	35	0.91	0.99	0.02	0.91	0.02	1.86	0.99

корреляции получены для обеих зависимостей (таблица 2), что не дает оснований для выделения одного из режимов как преобладающего. По-видимому, во всех случаях процесс протекает в смешанно-диффузионном режиме. В изученном ин-

тервале температур 25-35°C не зафиксировано фактов, свидетельствующих о возникновении дополнительных стерических препятствий для молекулы метиленового голубого при увеличении содержания железа в образцах. По-видимому,

пространственные затруднения возникают уже при введении минимального количества железа в образец, но при повышении концентрации железа остаются примерно на сопоставимом уровне, не возрастая настолько, чтобы вызвать переход из смешаннодиффузионного режима к выраженному лимитированию процесса внутренней диффузией. Наблюдаемые закономерности одинаковы для образцов, полученных при различных рН, несмотря на то, что диапазон рН ниже 2.0 считается метастабильной областью, а рН 5.0 отвечает типичному протеканию кислотного гидролиза алкоксидов кремния.

Для описания кинетики сорбции на поверхности твердых веществ обычно применяются модели псевдопервого и псевдодовторого порядка [18, 19]:

$$a_t = a_e \cdot (1 - e^{-k_1 t})$$
$$a_t = \frac{1}{\frac{1}{k_2 \cdot a_e^2} + \frac{t}{a_e}}$$

В таблице 2 представлены расчеты на основании указанных моделей для результатов адсорбции метиленового голубого на легированных кремнеземах при трех различных температурах.

При анализе данных таблицы 2 видно, что более адекватно адсорбция метиленового голубого на легированных силикагелях описывается моделью псевдодовторого порядка (модель Хо и Маккея). Об этом свидетельствуют как более высокие коэффициенты линейной корреляции, так и рост констант скорости с температурой при использовании данной модели при расчетах. Отметим, что наибольшие значения константы скорости получены для образцов с минимальным содержанием железа. С увеличением доли железа в образце константа скорости адсорбции снижается; этот факт косвенно подтверждает отсутствие избирательной адсорбции метиленового голубого на катионах железа. Существенно, что снижение скорости адсорбции симбатно уменьшению объема пор (табл. 1). Вероятно, причиной сниже-

ния значения эффективной константы является не изменение природы адсорбционных центров, а снижение их доступности для сорбата.

Заключение

Золь-гель методом при рН 1.5 и 5.0 синтезирован ряд кремнезёмов с различным содержанием катионов железа. Все образцы рентгеноаморфны. Изотермы низкотемпературной адсорбции азота имеют вид, характерный для микропористых образцов. Анализ кинетических кривых адсорбции метиленового голубого при трех различных температурах в рамках моделей Бойда и Морриса-Вебера показал, что для всех образцов адсорбция протекает в смешаннодиффузионном режиме. Значение рН гидролиза на характер диффузии синтезированных образцов не влияет. Кинетику адсорбции во всех случаях адекватно описывает модель псевдодовторого порядка. С увеличением доли железа в образце константа скорости адсорбции несколько снижается. Сделано заключение, что допирование кремнезёмов ионами железа приводит к небольшому снижению удельной поверхности и доступности сорбционных центров молекуле метиленового голубого, однако не приводит к преобладанию внутридиффузионных ограничений. Таким образом, допирование катионами железа, предназначенное для увеличения способности материалов к биодegradации, не снижает существенно их функциональных свойств – сорбционной способности, кинетических и диффузионных параметров адсорбции. Избежать значительного снижения константы скорости адсорбции возможно при использовании умеренных количеств железа.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.



Список литературы/References

1. Kaur M., Sharma S., Bedi P.M., Silica supported Brönsted acids as catalyst in organic transformations: A comprehensive review, *Chinese Journal of Catalysis*, 2015; 36(37): 520-549. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(14\)60299-0](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(14)60299-0)
2. Preeti S.S., Pradnya S.S., Kanchan K.P., Vedika M.B., Sandeep A.S., Sagar D.D., Sushilkumar A.J., A Brief Overview of Recent Progress in Porous Silica as Catalyst Supports, *Journal of Composites Science*, 2021; 5(3): 75. <https://doi.org/10.3390/jcs5030075>
3. Sudam K.P., Sukalyan D., Sabita P., Mishra B.K., Adsorption of organic molecules on silica surface, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006; 121: 13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.05.028>
4. Syeda S.F., Azry B., Muhammad A., Noraini A.G., Development and progress of functionalized silica-based adsorbents for CO₂ capture, *Journal of Molecular Liquids*, 2021; 338: 116913. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116913>
5. Engelhardt H., Löw H., Götzinger W., Chromatographic characterization of silica-based reversed phases, *Journal of Chromatography A*, 1991; 544: 371-379. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83996-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83996-0)
6. Yashin Y.I., Yashin A.Y., Sorbents for HPLC. Current state and new directions of development (review), *Sorption and chromatographic processes*, 2021; 21(2): 235-245. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3357>
7. Lok P.S., Sriman K.B., Rahul K., Geetika M., Usha S., Garima S., Saurabh A., Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2014; 214: 17-37. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.007>
8. Pajonk G.M. Some applications of silica aerogels // *Colloid and Polymer Science*, 2003; 281: 637-651. <https://doi.org/10.1007/s00396-002-0814-9>
9. Xinbin Y., Christopher T.W., Recent advances in the applications of mesoporous silica in heterogeneous catalysis, *Catalysis Science & Technology*, 2002; 19: 5777-5788. <https://doi.org/10.1039/D2CY00001F>
10. Khludneva A.S., Karpov S.I., Influence of the composition of the reaction medium on the structure and sorption properties of mesoporous silica, *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*, 2022; 22(4): 421-432. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10571> (In Russ.)
11. Hench L.L., West J.K., The Sol-Gel Process, *Chemical Reviews*, 1990; 90: 33-72. <https://doi.org/10.1021/cr00099a003>
12. Gonçalves M.C., Sol-Gel Silica Nanoparticles in Medicine: A Natural Choice. Design, Synthesis and Products, *Molecules*, 2018; 23(8): 22-26. <https://doi.org/10.3390/molecules23082021>
13. Pohaku Mitchell K.K., Liberman A., Kummel A.C., Trogler W.C., Iron (III)-Doped, Silica Nanoshells: A Biodegradable Form of Silica, *Journal of the American Chemical Society*, 2012; 134(34): 13997-14003. <https://doi.org/10.1021/ja3036114>
14. Decyk P., Trejda M., Ziolk M., Kujawa J., Głazyszka K., Bettahar M., Monteverdi, S.M., Mercy Physicochemical and catalytic properties of iron-doped silica—the effect of preparation and pretreatment methods, *Journal of Catalysis*, 2003; 219(1): 146-155. [https://doi.org/10.1016/S0021-9517\(03\)00186-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9517(03)00186-6)
15. Nayanova E.V., Elipasheva E.V., Sergeev G.M., Sergeeva V.P. Redox properties of methylene blue as a promising photometric reagent for determination of halogen oxidants. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2015; 19(2): 154-160. <http://dx.doi.org/10.15826/analitika.2015.19.2.005> (In Russ.)
16. Boyd G.E., Adamson A.V., Myers L.S. Chromatographic method of ion separation. Moscow, Chemistry Publ., 1949, pt. 1, 333 p.
17. Weber W. J., Morris J. C., Kinetics of



Adsorption on Carbon from Solution, *Journal of the Sanitary Engineering Division*, 1963; 89(2): 31-60. <https://doi.org/10.1061/JSEDAI.0000430>

18. Lagergren, S., About the theory of so-called adsorption of soluble substance, *Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 1898; 24: 1-39.

19. Ho Y.S., McKay G., Pseudo-second order model for sorption processes, *Process Biochemistry*, 1999; 34(5): 451-465. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00112-5)

Информация об авторах / Information about the authors

Е.Н. Титов – аспирант кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород; младший научный сотрудник, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия

Д.Е. Смальченко – ассистент кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

О.Е. Лебедева – заведующий кафедрой общей химии, д.х.н., профессор, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

E.N. Titov – PhD student, Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia, e-mail: titov.evgeniy96@gmail.com

D.E. Smalchenko – Assistant Prof., Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: smalchenko@bsu.edu.ru

O.E. Lebedeva – Head of Department, Doctor of chemical science, professor, Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: olebedeva@bsu.edu.ru

Статья поступила в редакцию 08.09.2023; одобрена после рецензирования 03.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 08.09.2023; approved after reviewing 03.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12137

Оценка образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775A электрофоретическим методом в листьях кукурузы при нормоксии и гипоксии

Дмитрий Николаевич Федорин,

Анна Евгеньевна Хомутова, Александр Трофимович Епринцев✉

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru✉

Аннотация. Недостаток кислорода наиболее чувствительно отражается на окислительных процессах клетки, в частности митохондриальном дыхании, и требует координации клеточного метаболизма. Одним из инструментов молекулярной эпигенетической регуляции служат микроРНК – класс некодирующих малых молекул РНК (20-22 нт), регулирующие экспрессию целевых генов на посттранскрипционном уровне путем ингибирования трансляции или расщепления их мРНК. Как известно, микроРНК могут действовать по пути РНК-интерференции, или связываться с комплексом РНК-индуцированного транскрипционного сайленсинга (RITS). Исследование роли микроРНК в адаптивной реакции клеточного метаболизма на гипоксический стресс изменения при гипоксии, как механизма молекулярного контроля, вызывает особый интерес. Применение фенол-хлороформной экстракции со специфическим осадителем для рибонуклеиновых кислот LiCl позволило получить из листьев кукурузы суммарную клеточную РНК. Полученные препараты РНК были хорошего качества, о чем свидетельствует наличие 2х четко выраженных полос 28S и 18S рРНК и отсутствие следов деградации. Полученные препараты суммарной клеточной РНК использовали в качестве матрицы при оценке формирования РНК-интерферирующих комплексов, образованных в виде дуплексных элементов РНК:РНК по принципу комплементарности между микроРНК775А и мРНК-мишенью. Для оценки образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775A применяли метод аналитического электрофореза в агарозном геле со специфичным флуоресцентным зондом, содержащим ROX. Данный метод позволил выявить соотношение количества образовавшихся РНК-интерферирующих комплексов клеточной мРНК с miR775A, разделенных на основе их молекулярных масс, в образцах при развитии гипоксических условий. Электрофорез в агарозном геле с последующей денситометрией показал наличие только одного интерферирующего комплекса с электрофоретической подвижностью 0.23-0.25 ед. Результаты показали, что miR775A взаимодействует с одной мРНК-мишенью в клетках листьев кукурузы в норме и при гипоксии. Количественная оценка интенсивности флуоресценции образованного комплекса мРНК-miR775A-зонд по эмиссии ROX свидетельствует об увеличении анализируемого показателя в образцах, выделенных из листьев кукурузы в условиях гипоксического стрессе.

Ключевые слова: *Zea mays*, микроРНК, электрофорез, денситометрия, РНК-интерференция

Для цитирования: Федорин Д.Н., Хомутова А.Е., Епринцев А.Т. Оценка образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775A электрофоретическим методом в листьях кукурузы при нормоксии и гипоксии // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24, № 2. С. 289-298.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12137>

Original article

Electrophoretic method and assessing the formation of an RNA-interfering complex with miR775A in corn leaves under the conditions of normoxia and hypoxia

Dmitry N. Fedorin, Anna E. Khomutova, Alexander T. Eprintsev✉

Voronezh State University, Voronezh, Russia, bc366@bio.vsu.ru✉

Abstract. Oxidative processes in cells, in particular mitochondrial respiration, are most sensitive to a lack of oxygen, therefore, it requires cell metabolism coordination. MicroRNAs are one of the tools of the molecular epigenetic regulation. These are a class of non-coding small RNA molecules (20-22 nt) that are able to regulate target genes expression at the post-transcriptional level by inhibiting the translation or cleavage of their mRNAs. It is known that microRNAs can act by RNA interference or can bind to an RNA-induced transcriptional silencing (RITS) complex. The study of the role of microRNAs in the adaptive response of cell metabolism to hypoxic stress as a mechanism of molecular control is of particular interest. Phenol-chloroform extraction with a specific precipitant for LiCl ribonucleic acids made it possible to obtain the total cellular RNA from corn leaves. The resulting RNA preparations were of good quality, which was indicated by the presence of 2 distinct bands of 28S and 18S rRNA and the absence of traces of degradation. The resulting preparations of total cellular RNA were used as a matrix to assess the formation of RNA interfering complexes which formed as RNA:RNA duplexes based on complementarity between microRNA775A and the target mRNA. The method of analytical agarose gel electrophoresis with a specific fluorescent probe with ROX was used to assess the formation of an RNA interfering complex with miR775A. This method made it possible to identify the ratio of the number of formed RNA-interfering complexes of cell mRNA with miR775A separated on the basis of their molecular masses in the samples under hypoxic conditions. Electrophoresis in agarose gel followed by densitometry revealed the presence of only one interfering complex with an electrophoretic mobility of 0.23-0.25 units. The results showed that miR775A interacted with a single target mRNA in corn leaf cells under normal conditions and under the conditions of hypoxia. Quantitative assessment of the fluorescence intensity of the formed complex of mRNA-miR775A-probe by ROX emission indicated an increase in the analysed indicator in samples isolated from corn leaves under hypoxic stress.

Keywords: *Zea mays*, microRNA, electrophoresis, densitometry, RNA interference

For citation: Fedorin D.N., Khomutova A.E., Eprintsev A.T. Electrophoretic method and assessing the formation of an RNA-interfering complex with miR775A in corn leaves under the conditions of normoxia and hypoxia. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(2): 289-298. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12137>

Введение

МикроРНК (miR) играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов-мишеней на посттранскрипционном уровне. Ряд микроРНК участвуют в модуляции толерантности к различным абиотическим стрессам. Ранее было показано изменение экспрессии ряда микроРНК в ответ на заболачивание и гипоксию [1]. miR159, miR164, miR167, miR393, miR408 и miR528 в основном участвуют в развитии корней и реакциях на стресс, но также оказались ключевыми регуляторами в условиях кратковременной гипоксии у кукурузы [2].

Несмотря на наличие данных о реакции растений на снижение уровня кислорода и механизмах контроля координации экспрессии генов-мишеней [3], важным представляется исследование участия микроРНК в ответной реакции клеток на стрессовый фактор. У растений микроРНК часто регулируют группы транскрипционных факторов, действующих путем нацеливания на почти иде-

ально комплементарные мРНК для эндонуклеолитического расщепления и ингибирования трансляции [4, 5]. Регуляция посредством микроРНК, по-видимому, играет важную роль в адаптации транскриптома к стрессовым факторам.

Поскольку активация микроРНК снижает количество целевых мРНК, микроРНК, активация которых происходит при гипоксии, может подавлять негативные регуляторы гипоксической реакции или замедлять рост растений во время стресса. И наоборот, подавление микроРНК увеличивает количество их целевых мРНК, что может помочь в адаптации к стрессу [6]. miR775 представляет собой уникальную микроРНК, специфичную для *Arabidopsis thaliana*, которая посттранскрипционно регулирует экспрессию генов-мишеней при гипоксическом стрессе. Роль miR775A проявляется в адаптации клеточного метаболизма за счет координации путей передачи сигналов этилена и путями биосинтеза АБК [7].

Идентификация мишеней микроРНК является сложным, но очень важным эле-



ментом в объяснении функций микроРНК. Действие микроРНК на их мишени мРНК трудно проиллюстрировать, поскольку множественные микроРНК нацелены на один и тот же ген и наоборот [8-10]. Высокая комплементарность спаривания с мишенями является основным требованием для функционирования микроРНК растений. Многочисленные лабораторные и биоинформатические исследования направлены на выявление эффективных методологий распознавания мишеней микроРНК. Однако сообщалось о нескольких факторах, влияющих на взаимодействие микроРНК:мРНК, которые можно классифицировать следующим образом [11]. Комплементарность между микроРНК и ее мишенью является ключевой особенностью стабильности дуплекса микроРНК:мРНК [12]. Одним из простых и эффективных методов идентификации мРНК, связанных с микроРНК, является электрофоретическое разделение суммарной клеточной мРНК, с последующей идентификацией дуплекса микроРНК:мРНК. Анализ изменения электрофоретической подвижности разных по размеру матричных РНК (мРНК) представляет собой чувствительный метод анализа взаимодействия РНК-РНК. Данный метод изучения взаимодействия микроРНК и ее целевой мРНК, основан на образовании комплекса [13], идентифицируемого по эмиссии флуорофора, входящего в состав специфического нуклеотидного зонда, в качестве которого выступает комплемент к анализируемой микроРНК [14].

В связи с этим, целью данного исследования являлось применение электрофоретического метода в идентификации дуплекса микроРНК775А:мРНК-мишеней в листьях кукурузы при гипоксии.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования в работе использовали листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом

при 12 часовом световом дне. Создание низких концентраций кислорода в среде осуществлялось путем помещения растений с предварительно удаленной корневой системой на 24 часа в вакуум-эксикатор, в который подавался азот. В качестве контрольной группы использовались растения с предварительно удаленной корневой системой, помещенные в вакуум-эксикатор в условиях нормальной аэрации. Для исключения влияния фотосинтетической системы обе группы растений предварительно экспонировались в темноте в течение 24 часов до проведения эксперимента. На протяжении всего времени эксперимента растения также находились в условиях отсутствия источников света [15].

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl [16]. Качественный анализ РНК проводили путем электрофоретического исследования в геле 1% агарозы. Красителем выступал бромистый этидий. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим методом на приборе NanoPhotometer C40 (Implen, Германия).

Анализ РНК-интерференции и РНК-зависимого метилирования ДНК проводили с применением флуоресцентного зонда ROX-miR775A, представляющего собой нуклеотидную последовательность, комплементарную зрелой микроРНК775A с флуорофором ROX на 3'-конце. Для анализа брали 100 нг суммарной клеточной РНК. Результаты оценивали электрофоретическим методом в 1% агарозном геле. Интеркалирующим красителем электрофореграмм нуклеиновых кислот выступал SybrGreen I. Фотовозбуждение SYBR Green I проводили облучением при 312 нм и оценивали эмиссию ROX.

Денситометрический анализ гелей осуществляли с применением программного обеспечения GelAnalyzer 19.1

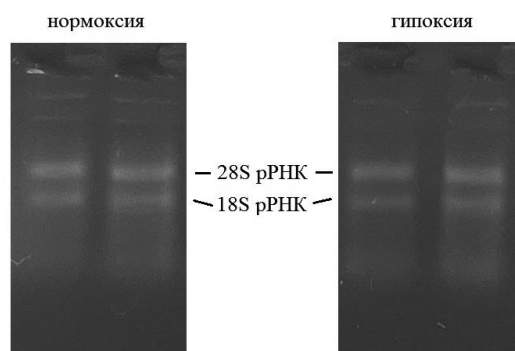


Рис. 1. Типичная электрофореграмма суммарной клеточной РНК из листьев кукурузы, выделенной фенол-хлороформной экстракцией с LiCl в качестве специфического осадителя рибонуклеиновых кислот. Нормоксия – растения, выдержанные в обычных условиях. Гипоксия – растения, подвергшиеся воздействию низких концентраций кислорода, созданная средой азота.

Fig. 1. A typical electrophoretogram of total cellular RNA from corn leaves isolated by phenol-chloroform extraction with LiCl as a specific precipitant of ribonucleic acids. Normoxia means plants were kept under normal conditions. Hypoxia means plants were exposed to low oxygen concentrations due to the nitrogen environment.

(www.gelalyzer.com). Каждый опыт проводился в 3-4 кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. На рисунках приводятся данные опытов, каждое значение есть среднее из трех измерений. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев [17]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0.05$. Изображения электрофореграммы представляют собой данные типичного эксперимента, повторенного три-четыре раза.

Обсуждение результатов

Из листьев кукурузы, выращенных в нормоксии и при гипоксических условиях, была проведена экстракция суммарной РНК. Из приведенных данных на рисунке 1 видно, что в гелевых пластинках наблюдается очевидное преобладание количества 28S рРНК над 18S, во всех образцах в разное время эксперимента, что является одним из важных критериев качества препарата РНК. Высокое качество полученных препаратов позволило использовать их в качестве матрицы при оценке формирования РНК-

интерферирующих комплексов, основанных на образовании дуплексных элементов по принципу комплементарности между микроРНК775А и мРНК-мишенью [13].

Известно, что микроРНК могут осуществлять посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов путем РНК-интерференции. Поступая из ядра в цитоплазму, miR связывается комплексом РНК-индуцированного сайленсинга (RISC). Репрессия целевого транскрипта с помощью микроРНК может происходить посредством ингибирования трансляции, ускорения экзонуклеолитического распада мРНК или разрезания в пределах образования дуплексов микроРНК-мРНК [18]. Это способствует временной регуляции гена-мишени, а также подавление синтеза соответствующего белка. Кроме того, микроРНК может связаться с ДНК при формировании комплекса RITS, что приводит к переформированию гетерохроматина, в том числе, посредством метилирования [19].

Для оценки образования РНК-интерферирующего комплекса с miR775А применяли метод аналитического электрофореза со специфичным флуоресцентным зондом. Данный метод позволил выявить

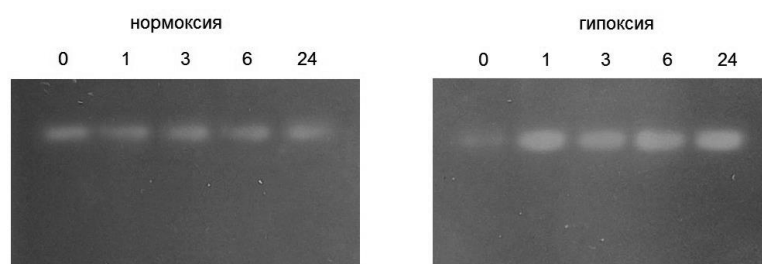


Рис. 2. Электрофореграмма образцов РНК-интерферирующего комплекса с miR775A в листьях кукурузы при нормоксии и гипоксии. 0, 1, 3, 6, 24 – растения, выдержанные в соответствующих экспериментальных условиях в течение 1, 3, 6 и 24 часов

Fig. 2. Electrophoretogram of samples of the RNA interfering complex with miR775A in corn leaves under normoxia and hypoxia conditions. 0, 1, 3, 6, 24 stands for plants kept under corresponding experimental conditions for 1, 3, 6, and 24 hours

соотношение количества образовавшихся РНК-интерферирующих комплексов мРНК клетки с miR775A в образцах при различных по времени гипоксических условиях.

Электрофорез в агарозном геле позволил установить наличие РНК-интерферирующего комплекса, формирующегося при участии микроРНК miR775A. При этом, результаты свидетельствуют об образовании одного интерферирующего комплекса с анализируемой микроРНК (рис. 2).

Результаты электрофореза указывают на то, что miR775A действует по пути РНК-интерференции, связываясь с комплексом RISC, и посттранскрипционно взаимодействует с комплементарной ей мРНК. Об этом свидетельствуют образовавшиеся флуоресцентные структуры – триплексы, представляющие собой комплекс мРНК- miR775A-зонд (рис. 2).

Электрофоретическое разделение суммарной РНК, выделенной из листьев кукурузы в норме и при гипоксии, позволяет провести выделение отдельных мРНК генов на основании их размеров. Инкубация гелевой пластинки с флуоресцентным зондом к miR775A привела к формированию единственного специфического триплекса с мРНК-мишенью во всех анализируемых образцах. Результаты электрофоретического исследования с зондом к miR775A указывают на

наличие в анализируемых образцах суммарной РНК из листьев кукурузы в норме и при гипоксии одной мишени для сайленинга при участии комплекса RISC.

Денситометрия электрофоретических пластинок позволила выявить изменение в величине интенсивности флуоресценции комплекса мРНК- miR775A-зонд. В образцах из листьев кукурузы в нормоксии величина пиков образованного комплекса в разное время эксперимента характеризуется постоянной величиной. Кроме того, результаты денситограммы указывают на однородность пика флуоресценции с электрофоретической подвижностью 0.23-0.25 ед., что подтверждает формирование только одного интерферирующего клеточной мРНК комплекса с микроРНК775A (рис. 3).

Результаты денситометрии образцов суммарной РНК из листьев кукурузы, подвергшихся воздействию гипоксических условий, показывают однородность формирования комплекса мРНК- miR775A-зонд. Установлено, что электрофоретическая подвижность интерферирующего комплекса микроРНК775A с клеточной мРНК комплекса составляет величину 0.23-0.25 ед., что подтверждает наличие только одной мРНК-мишени (рис. 4), соотносящейся с таковой в образцах мРНК из листьев кукурузы в нормоксии. На денситограмме видно, что интерферирующий комплекс совпадает по анализируемым показателям такового у

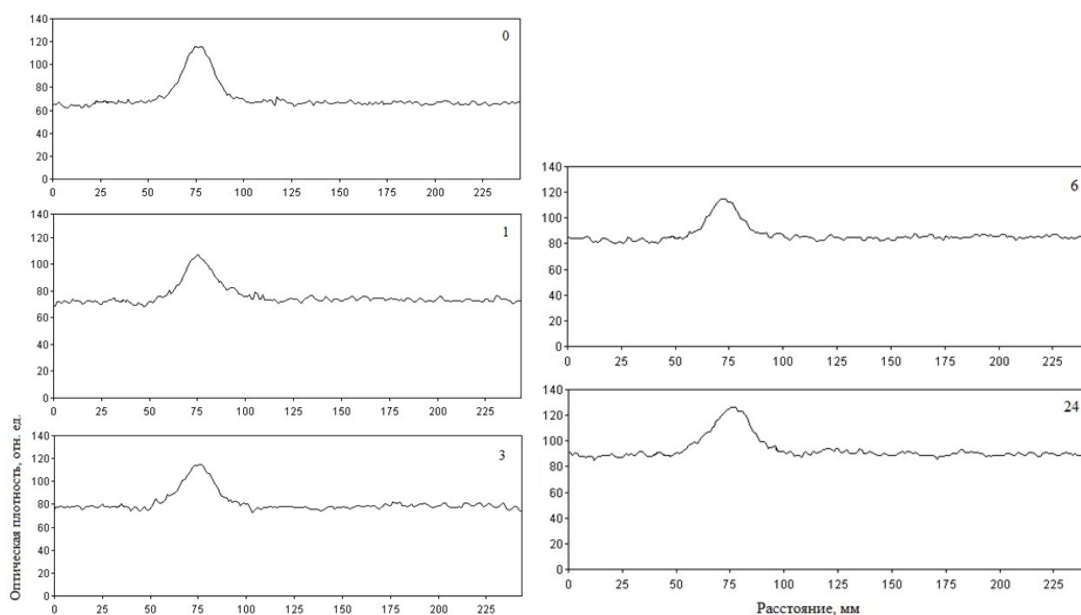


Рис. 3. Денситограмма образцов РНК-интерферирующего комплекса с miR775A в листьях кукурузы в норме. 0, 1, 3, 6, 24 – растения, выдержанные в стандартных условиях в течение 1, 3, 6 и 24 часов.

Fig. 3. Densitogram of samples of the RNA interfering complex with miR775A in corn leaves under normal conditions. 0, 1, 3, 6, 24 stands for plants kept under standard conditions for 1, 3, 6, and 24 hours.

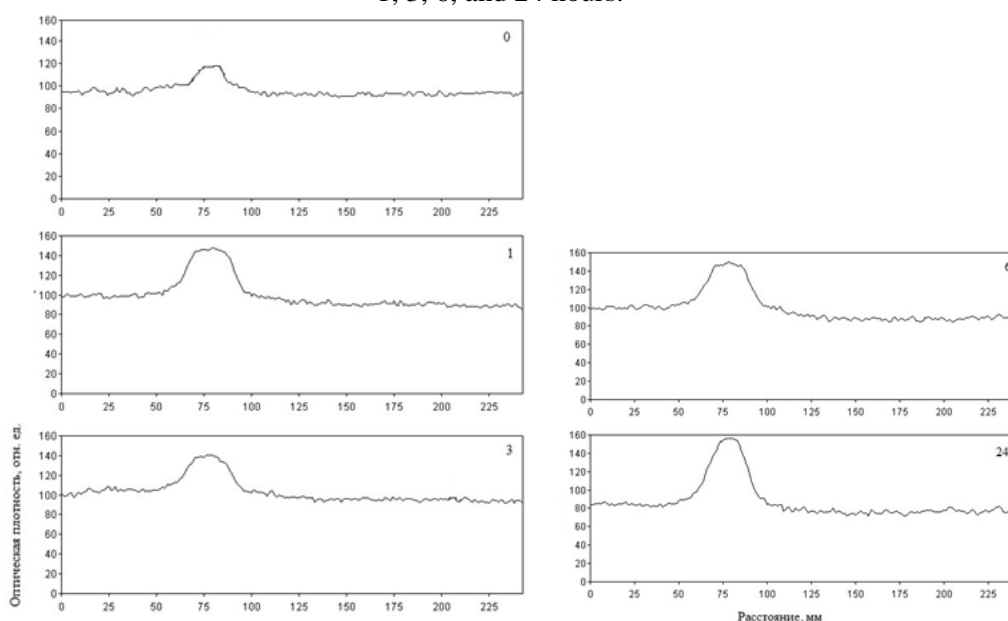


Рис. 4. Денситограмма образцов РНК-интерферирующего комплекса с miR775A в листьях кукурузы при гипоксии. 0, 1, 3, 6, 24 – растения, выдержанные в условиях гипоксии в течение 1, 3, 6 и 24 часов.

Fig. 4. Densitogram of samples of the RNA interfering complex with miR775A in corn leaves under the conditions of hypoxia. 0, 1, 3, 6, 24 stands for plants kept under hypoxia conditions for 1, 3, 6, and 24 hours.

контрольных растений, что свидетельствует об отсутствии изменений в количестве мишеней для РНК-интерференции

при участии miR775A. Количество интерферирующих комплексов с мик-

Таблица 1. Количественные характеристики флуоресценции комплекса мРНК- miR775A-ROX в образцах суммарной РНК из листьев кукурузы в норме и при гипоксии
 Table 1. Quantitative characteristics of fluorescence of mRNA- miR775A-ROX complex in samples of the total RNA from corn leaves under normal conditions and under conditions of hypoxia

		Время эксперимента, ч				
		0	1	3	6	24
Интенсивность флуоресценции, отн. ед.	норма	117	112	118	118	125
	гипоксия	118	150	147	153	158

роРНК775А в листьях кукурузы при гипоксическом стрессе не изменяется на протяжении 24 часов эксперимента.

Мишенью чувствительных к гипоксии микроРНК, в частности miR775A, являются факторы транскрипции, принадлежащие к семействам MYB [20]. Белки MYB составляют большое семейство растительных транскрипционных факторов, члены которых выполняют множество функций в биологических процессах растений [21]. Транскрипционный фактор AtMYB2, индуцируемый гипоксией, действует как ключевой регуляторный фактор при индукции промотора фермента алкогольдегидрогеназы (ADH1) при низком уровне кислорода [22]. Это свидетельствует об участии miR775A в регуляции окислительного метаболизма, подвергающегося ингибированию при недостатке кислорода.

Количественная оценка результатов денситометрического анализа электрофореграмм указывает, что при нормоксии в образцах «Контроль 0ч» величина оптической плотности достигла 117 отн.ед, а в образце «Контроль 1ч» – 112 отн.ед. В образце «Контроль 3ч» и «Контроль 6ч» оптическая плотность достигла 118 отн.ед. В образце «Контроль 24ч» наблюдался скачок до 125 отн.ед. (табл. 1). Следовательно, в норме в клетках листьев кукурузы находится стабильный уровень мРНК-мишени для miR775A, на что указывает практически постоянный уровень

флуоресценции ROX при формировании интерферирующего комплекса.

При гипоксии в образцах «Опыт 0ч» величина оптической плотности достигала 118 отн.ед. В образцах «Опыт 1ч» и «Опыт 3ч» зафиксирована оптическая плотность величиной 150 отн.ед. и 147 отн.ед., соответственно. В образцах «Опыт 6 ч» и «Опыт 24 ч» величина оптической плотности увеличивалась и достигла значений 153 и 158 отн.ед, соответственно (табл. 1).

Увеличение флуоресценции ROX сформированных комплексов мРНК-miR775A-зонд указывает на интенсификацию деградации мРНК-мишени за счет увеличения miR775A и образования большего количества интерферирующих комплексов. Интенсификация РНК-интерференции с участием miR775A в листьях кукурузы при развитии гипоксии указывает на участие последней в негативной регуляции, обеспечивающей формирование ответной реакции клеточного метаболизма на стрессовое воздействие.

Заключение

На первом этапе нами успешно проведена экстракция тотальной РНК из зеленых листьев кукурузы с последующей обратной транскрипцией мРНК. Для экстракции РНК применяли фенол-хлороформную экстракцию со специфическим осадителем РНК – хлоридом лития. Основной принцип предполагает взаимодействие между сахаром рибозы РНК и положительными катионами (литием),

что позволяет образовывать комплексы только с РНК, осаждаемые в присутствии этанола, не допуская присутствия ДНК и белка [23]. Применение этого вещества позволило выделить общую РНК практически без следов дегградации.

Оценка образования РНК-интерферирующего комплекса с помощью специфического ROX-содержащего зонда показала, что микроРНК miR775A действует по пути РНК-интерференции, связываясь с комплексом RISC, и посттранскрипционно взаимодействует с комплементарной ей мРНК.

Количественная оценка интенсивности флуоресценции образованного комплекса мРНК-miR775A-зонд по эмиссии ROX свидетельствует об увеличении анализируемого показателя в образцах, выделенных из листьев кукурузы в условиях гипоксического стресса. Наибольшая интенсивность флуоресценции наблюдалась на 24 час стрессового воздействия, в то время как в нормоксии величина данного показателя практически не изменялась на протяжении всего эксперимента.

Электрофоретическое разделение мРНК суммарной вытяжки клеточной РНК в 1% агарозном геле, основанное на различии их молекулярных масс, позволило провести количественную оценку

Список литературы/References

1. Hou, Y., Jiang, F., Zheng, X., Wu Z. Identification and analysis of oxygen responsive microRNAs in the root of wild tomato (*S. habrochaites*). *BMC Plant Biol.* 2019; 19: 100. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1698-x>
2. Liu Z., Kumari S., Zhang L., Zheng Y., Ware D. Characterization of miRNAs in response to short-term waterlogging in three inbred lines of *Zea mays*. *PLoS One.* 2012; 7: e39786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039786>
3. Bailey-Serres J., Chang R. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. *Annals*

формирования интерферирующих комплексов с miR775A. Результаты исследования свидетельствуют, что в нормоксии и при гипоксическом воздействии на растения кукурузы в клетках листьев формируется только один комплекс, основанный на комплементарном взаимодействии мРНК-мишени и флуоресцентного специфического зонда miR775A-ROX. Формирование единственного дуплекса мРНК-miR775A указывает на регуляцию формирования белкового компонента, кодируемого данной мРНК. Белки MYB, выполняющих регуляторную функцию в биологических процессах растений, являются мишенью для микроРНК775A [21]. Следовательно, при гипоксии в клетках листьев кукурузы микроРНК775A контролирует количество транскрипционного фактора семейства MYB, регулирующего клеточный ответ в стрессовых условиях.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

of Botany. 2005; 96: 507-518. <https://doi.org/10.1093/aob/mci206>

4. Vazquez F. Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends in Plant Science.* 2006; 11: 460-468. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.07.006>

5. Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L., Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science.* 2008; 320: 1185-1190. <https://doi.org/10.1126/science.1159151>

6. Betti F., Ladera-Carmona M. J., Perata P., Loreti E. RNAi Mediated Hypoxia Stress Tolerance in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*



- 2020; 21: 9394. <https://doi.org/10.3390/ijms21249394>
7. Mishra V., Singh A., Gandhi N., Das S.S., Yadav S., Kumar A., Sarkar A.K. A unique miR775-GALT9 module regulates leaf senescence in Arabidopsis during post-submergence recovery by modulating ethylene and the abscisic acid pathway. *Development*. 2022; 149: dev199974. <https://doi.org/10.1242/dev.199974>
8. Riffo-Campos A.L., Riquelme I., Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 1987. <https://doi.org/10.3390/ijms17121987>
9. Kulkarni S.R., Vanechoutte D., de Velde J.V., Vandepoele K. TF2Network: predicting transcription factor regulators and gene regulatory networks in Arabidopsis using publicly available binding site information. *Nucl. Acids Res.* 2018; 46: e31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1279>
10. Wani SH, Tripathi P, Zaid A, Challa G.S., Kumar A., Kumar V., Upadhyay J., Joshi R., Bhatt M. Transcriptional regulation of osmotic stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.* 2018; 97: 469-487. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0761-6>
11. Tyagi S., Sharma S., Ganie S.A., Tahir M., Mir R.R., Pandey R. Plant microRNAs: biogenesis, gene silencing, web-based analysis tools and their use as molecular markers. *3 Biotech.* 2019; 9: 413. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1942-y>
12. Ding J., Zhou S., Guan J. Finding microRNA targets in plants: current status and perspectives. *Genom Proteom Bioinform.* 2012; 10: 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.09.003>
13. Morita T., Maki K., Aiba H. Detection of sRNA-mRNA Interactions by Electrophoretic Mobility Shift Assay. *Methods Mol. Biol.* 2012; 905: 235-244. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-949-5_15
14. Paugh S.W., Coss D.R., Bao J., Lauder milk L.T., Grace C.R., Ferreira A.M., Brett Waddell M., Ridout G., Naeve D., Leuze M., LoCascio P.F., Panetta J.C., Wilkinson M.R., Pui C-H., Naeve C.W., Uberbacher E.C., Bonten E.J., Evans W.E. MicroRNAs Form Triplexes with Double Stranded DNA at Sequence-Specific Binding Sites; a Eukaryotic Mechanism via which microRNAs Could Directly Alter Gene Expression. *PLoS Comput. Biol.* 2016; 12: e1004744. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004744>
15. Eprintsev A.T., Anokhina G.B., Gataullina M.O., Fedorin D.N. Rol' epigeneticheskikh mekhanizmov v regulyatsii aktivnosti 2-OGDG i MDG v list'yakh kuku ruzy (*Zea mays* L.) pri gipoksii. *Fiziologiya rasteniy.* 2021; 68: 187-193. <https://doi.org/10.31857/S0015330321010061>
16. Chomczynski P., Sacchi N. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
17. Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher school, 1990. 351p. (In Russ.)
18. Voinnet O. Origin biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell.* 2009; 136: 669-687. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>
19. Bhattacharjee S., Roche B., Martienssen R.A. RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS) complex structure and function. *RNA Biology.* 2019; 16: 1133-1146. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1621624>
20. Moldovan D., Spriggs A., Yang J., Pogson B.J., Dennis E.S., Wilson I.W. Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 2010; 61: 165-177. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp296>
21. Ambawat S., Sharma P., Yadav N.R., Yadav R.C. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2013; 19: 307-321. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1>
22. Hoeren F.U., Dolferus R., Wu Y., Peacock W.J., Dennis E.S. Evidence for a



role for AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics*. 1998; 149: 479-490. <https://doi.org/10.1093/genetics/149.2.479>

23. Gautam A. Lithium Chloride-Based Isolation of RNA. In: DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert. *Springer, Cham*. 2022: 69-72. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_8

Информация об авторах / Information about the authors

Д.Н. Федорин – доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, доцент, кандидат биологических наук. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Е. Хомутова – бакалавр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Т. Епринцев – заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, профессор, доктор биологических наук. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

D.N. Fedorin – Associate Professor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Associate Professor, Candidate of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russia

A.E. Khomutova – Bachelor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia

A.T. Eprintsev – Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Professor, Doctor of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russia

Статья поступила в редакцию 29.01.2024; одобрена после рецензирования 03.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 29.01.2024; approved after reviewing 03.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.

ХРОМАТОГРАФИЯ – ОБЛАСТЬ НАШЕЙ КОМПЕТЕНЦИИ

инновации, технологии, оборудование и расходные материалы

РАЗРАБАТЫВАЕМ:

- технологии очистки субстанций
- методы выделения и очистки примесей
- сорбенты для всех видов жидкостной хроматографии
- методы контроля безопасности и подлинности продуктов питания и кормов



ПРОИЗВОДИМ:

- сорбенты для хроматографии
- концентрирующие патроны «Диапак»
- аналитические ВЭЖХ-колонки «Диасфер» и «Наутилус»
- аналитические комплекты для экологического анализа и контроля подлинности и безопасности продуктов питания и кормов
- препаративные колонны динамического аксиального сжатия АХИОМА диаметром 100 и 200 мм для очистки субстанций методом ВЭЖХ
- стеклянные колонки аксиального сжатия диаметром от 24 до 450 мм, объемом до 50 л
- автоматизированные хроматографические комплексы низкого давления АХИОМА для очистки субстанций с потоками элюента до 1 литра в минуту

К нам обращаются фармацевтические компании и другие организации для разработки технологий очистки субстанций «под ключ» и наработки стандартных образцов или примесей субстанций, когда это сложно или невыгодно делать на собственном производстве. Мы изучаем и сравниваем существующие методы очистки, опираясь на 30-летний опыт работы, добиваемся целевых показателей, масштабируем результаты, подбираем оборудование и расходные материалы, обучаем персонал заказчика. Не занимаемся технологиями очистки в нормально-фазовом режиме с применением органических растворителей в качестве элюентов.

Рассматриваем работы как по выделению и очистке небольших количеств субстанций или примесей, так и технологии очистки промышленного масштаба. Внедрим технологию на вашем производстве, используя современные непрерывные технологии очистки и колонки большого диаметра, увеличим производительность, снизим риск ошибок, обеспечим устойчивость технологического процесса.



Biotage

ChromaCon

KNAUER

Kromasil

ПРЕДСТАВЛЯЕМ ПРОДУКЦИЮ:

- **Biotage AB (Швеция)** – пробоподготовка, органический и пептидный синтез
- **Chromacon (Швейцария)** – препаративные системы для непрерывной хроматографии
- **Knauder GmbH (Германия)** – препаративная и аналитическая хроматография
- **Nouryon (Швеция)** – сорбенты и колонки для хроматографии
- **A.I.T.France (Франция)** – оборудование для безопасной работы с растворителями

Увеличьте производительность пептидного и органического синтеза, используя микроволновые реакторы Initiator+. Для быстрой очистки полученных соединений используйте флеш-хроматографы Select. Высокоскоростные упариватели позволят вам получить готовое вещество из раствора за считанные минуты. Быстрота получения результатов, удобство работы и надежность оборудования – девиз компании Biotage.

Компания Chromacon с препаративной хроматографической системой Contichrom не имеет аналогов в мире. Она позволяет в непрерывном режиме MCSGP нарабатывать высокоочищенные субстанции, а в режиме N-Rich – примеси с производительностью и качеством, не достижимыми традиционными методами.

Препаративные хроматографические системы AZURA позволяют на одном приборе и разрабатывать, и масштабировать метод очистки за счет широкого диапазона скоростей потока и разнообразия используемых модулей в блоках Assistant.

Автоматизированное оборудование Biotage для подготовки проб позволит сделать рутинную работу легкой и займет совсем немного времени, а хроматографические сорбенты и ВЭЖХ-колонки Kromasil (Nouryon) незаменимы, если важна максимальная воспроизводимость от партии к партии как в контроле фармацевтических препаратов, так и в технологиях очистки.

Простое оборудование A.I.T.France обеспечит безопасную работу Вашего персонала с элюентами, содержащими токсические компоненты и растворители.

Цена свободная

*Подписка по каталогу «Почта России»,
подписной индекс ПН132*

*При перепечатке и цитировании
ссылка на «Сорбционные и хроматографические процессы»
обязательна*

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

*Авторы статей, опубликованных в данном журнале, декларируют отсутствие явных
и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией их статей*

Подписано в печать 10.05.2024. Формат 60×84 ½

Дата выхода в свет 05.06.2024

Усл. печ. л. 16,51. Тираж 50 экз. Заказ 104

Отпечатано в типографии ООО ИПЦ «Научная книга»

394026, г. Воронеж, Московский пр-т, 11/5

Тел.: +7 (473) 229-32-87

<http://www.n-kniga.ru> E-mail: nautyp@yandex.ru

6+