

ISSN 1680-0613

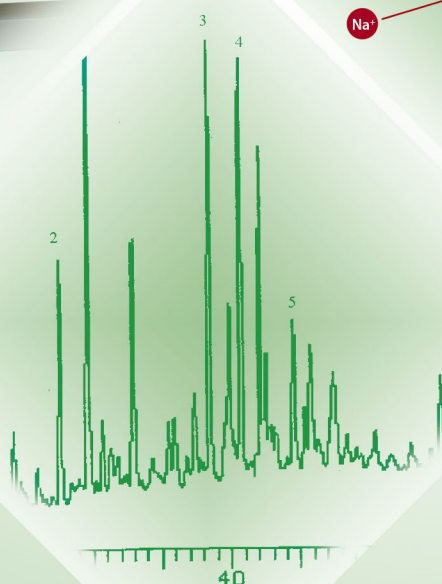
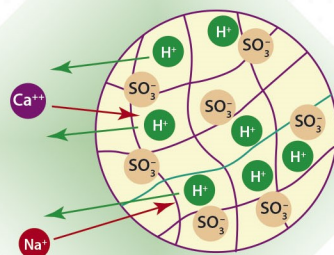


СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Том 22, № 6, 2022

SORPTION AND CHROMATOGRAPHY PROCESSES

Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssessy



<https://journals.vsu.ru/sorpchrom>

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Научный журнал
Выходит 6 раз в год

Том 22, № 6, 2022

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)
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. Несгеренко д-р хим.наук, проф. (МГУ, Москва)
И.А. Платонов, д-р техн.наук, проф. (СГАУ, Самара)
В.Н. Попов, д-р биол.наук, проф. (Воронеж)
Т.Н. Попова, д-р биол.наук, проф. (Воронеж)
SenGupta Arup, Ph.D., prof. (Lehigh University, Bethlehem, U.S.A)
Р.Х. Хамизов, д-р хим.наук (ГЕОХИ РАН, Москва)
В.Ю. Хохлов, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
В.А. Шапошник, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
О.А. Шпигун, член-корреспондент РАН (МГУ, Москва)
Я.И. Яшин, д-р хим.наук, проф. (НТИЦ «Хроматография», 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, 2022

SORBTSIONNYE I KHROMATOGRAFICHESKIE PROTSESSY (SORPTION AND CHROMATOGRAPHY PROCESSES)

Scientific journal
Published 6 times per year

Volume 22, No 6, 2022

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)

DEPURY-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)

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)

V.N. Popov, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

T.N. Popova, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

SenGupta Arup, Ph.D., prof. (Lehigh University,
Bethlehem, U.S.A)

R.Kh. Khamizov, Dr.Sc., Prof. (GEOKHI RAS, Moscow)

V.Yu. Khokhlov, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

V.A. Shaposhnik, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

O.A. Shpigun, corresponding member of the RAS
(MSU, Moscow)

Ya.I. Yashin, Dr.Sc., Prof. (STC «Chromatografiya», 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 Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy
must be cited

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



© Voronezh State University, 2022

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

2022, Том 22, № 6



Выходит 6 раз в год

CONTENTS

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Яшин А.Я., Яшин Я.И. Определение каротиноидов методом ВЭЖХ, их антиоксидантная активность и влияние на здоровье человека (обзор)	794-803	Yashin A.Ya., Yashin Ya.I. Determination of carotenoids by HPLC, their antioxidant activity and impact on human health (review).
Прудковский А.Г., Хамизов Р.Х., Комарова И.В., Галкина Н.К. Самоподдерживающиеся процессы умягчения-опреснения подземной солоноватой воды	804-815	Prudnikovskiy A.G., Khamisov R.Kh., Komarova I.V., Galkina N.K. Self-sustaining processes for the softening and desalination of underground brackish water
Гончарова Е.Н., Габидуллина Д.Э., Селимов Р.Н., Коряковцев П.А., Карсакова Ю.В., Козлов С.В., Комаров А.А., Енгашева Е.С., Енгашев С.В., Уша Б.В., Гламаздин И.Г., Удавлиев Д.И. ВЭЖХ-МС/МС определение амоксициллина в плазме крови с использованием дериватизации	816-828	Goncharova E.N., Gabidullina D.E., Selimov R.N., Koryakovtsev P.A., Karsakova Yu.V., Kozlov S.V., Komarov A.A., Engasheva E.S., Engashev S.V., Usha B.V., Glamazdin I.G., Udavliev D.I. HPLC-MS/MS determination of amoxicillin in blood plasma using derivatisation.
Заболотных С.А., Батуева Т.Д., Чеканова Л.Г. Сорбция ионов Мо(VI) и Ре(VII) на кремнеземе, модифицированном диметилгидразидами кислот Versatic	829-840	Zabolotnykh S.A., Batueva T.D., Chekanova L.G. Adsorption of Mo(VI) and Re(VII) ions on silica modified with Versatic acid dimethyl hydrazides
Мещерякова О.Л., Василенко Л.И., Губин А.С., Свиридова Т.В., Корнеева О.С. Анализ аминокислотного состава и структуры изолятов белка амаранта при различных условиях его выделения	841-848	Meshcheryakova O.L., Vasilenko L.I., Gubin A.S., Sviridova T.V., Korneeva O.S. Analysis of an amino acid composition and the structure of amaranth protein isolates under different conditions of protein isolation.
Шмойлова Я.Ю., Иванов Д.Э., Ковыгин Ю.А., Шихалиев Х.С. Исследование маршрута реакции 1,3-дифенил-1Н-пиразол-5-амина с N-(4-фторфенил)итаконимидом методом ВЭЖХ-МС	849-855	Shmoilova Ya.Yu., Ivanov D.E., Kovygin Yu.A., Shikhaliev Kh.S. A study of the reaction route of 1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-amine with N-(4-fluorophenyl)itaconimide by HPLC-MS
Нурмухаметова К.Р., Лебедева Е.Л., Петрова Ю.С., Неудачина Л.К. Исследование сорбции аргинина сульфоэтилированным хитозаном с последующим определением методом капиллярного электрофореза	856-868	Nurmukhametova K.R., Lebedeva E.L., Petrova Yu.S., Neudachina L.K. A study of arginine sorption by sulfoethylated chitosan followed by a capillary electrophoresis

<p>Кравцова С.Е., Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Матасова Л.В., Лебедева Ю.И. Применение ионообменной хроматографии для очистки глутатионредуктазы из печени крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени для исследования некоторых каталитических свойств</p>	869-876	<p>Kravtsova S.E., Popova T.N., Kryl'skii E.D., Matasova L.V., Lebedeva Yu.I. Using ion-exchange chroma-tography to purify glutathione reductase from the liver of rats with paracetamol-induced liver disease to investigate some catalytic properties</p>
<p>Громовик А.И., Горбунова Н.С. Формирование горизонта плужной подшвы в черноземах и ее сорбционные особенности в отношении органического вещества и тяжелых металлов</p>	877-884	<p>Gromovik A.I., Gorbunova N.S. Formation of the tillage pan bottom horizon in black soils and its sorption features with respect to organic matter and heavy metals</p>
<p>Федорин Д.Н., Чуйкова В.О., Епринцев А.Т. Модификация методики выделения микроРНК из растений фенол-хлороформной экстракцией с применением полиэтиленгликоля 1500</p>	885-892	<p>Fedorin D.N., Chuykova V.O., Eprintsev A.T. Modification of the method for isolating miRNAs from plants phenol-chloroform extraction using polyethylene glycol 1500</p>
<p>Нестерова Е.Ю., Гладких М.И., Сыромятников М.Ю., Попов В.Н. Оптимизация метода выделения нуклеиновых кислот из кефира с помощью сорбента на основе диоксида кремния</p>	893-900	<p>Nesterova E.Yu., Gladkikh M.I., Syromyatnikov M.Yu., Popov V.N. Optimising the method of isolating nucleic acids from kefir using a silica-based sorbent</p>
<p>Свиридова Е.С., Колесова Ю.А., Воронюк И.В., Елисеева Т.В., Мухин В.М. Особенности сорбции гидроксibenзальдегидов из водных растворов активированным углем ВСК-400</p>	901-908	<p>Sviridova E.S., Kolesova Yu.A., Voronyuk I.V., Eliseeva T.V., Mukhin V.M. Features of sorption of hydro xybenzaldehydes from aqueous solutions with activated carbon VSK-400</p>



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10886

Определение каротиноидов методом ВЭЖХ, их антиоксидантная активность и влияние на здоровье человека (обзор)

Александр Яковлевич Яшин^{1✉}, Яков Иванович Яшин¹

¹Группа компаний «Сайтегра», Москва, Россия, yashin@scietegra.com[✉]

Аннотация. Каротиноиды – широко распространенные соединения в пищевых продуктах. Их обнаружено около 1100, в значимых количествах в пище около 50, в плазме крови обнаружено 30 каротиноидов. Основные методы определения каротиноидов – это методы ВЭЖХ с разными детектирующими системами. Для идентификации каротиноидов используют методы ВЭЖХ с МС и МС-МС детекторами. С использованием методов ВЭЖХ созданы базы данных содержания каротиноидов в пищевых продуктах во многих странах Америки, Азии и Европы. За счет многих сопряженных связей (до 11) каротиноиды обладают антиоксидантной активностью.

Наибольшей антиоксидантной активностью обладает астаксантин, находящейся в красной рыбе, красной икре и креветках. За счет антиоксидантной активности каротиноиды обладают значительными оздоровительными эффектами. Регулярное потребление каротиноидов значительно снижает риск самых опасных болезней: сердечно-сосудистых, онкологических, диабета и др. Наибольшая смертность населения от этих болезней. Каротиноиды подавляют окислительный стресс-предшественник многих болезней, в т. ч. и самых опасных. Каротиноиды повышают иммунитет, убирают воспалительные процессы. Они эффективны при болезнях глаз и печени. Каротиноиды производят в мире в больших количествах, глобальный рынок более 1.5 млрд. долларов. Производятся в больших объемах: бета-каротин, ликопин, лутеин и астаксантин. По влиянию каротиноидов на здоровье человека опубликовано более 6000 научных работ.

Ключевые слова: каротиноиды, ВЭЖХ, детекторы, анализ, базы данных, профиль содержания, оздоровительные эффекты, рынок каротиноидов.

Для цитирования: Яшин А.Я., Яшин Я.И. Определение каротиноидов методом ВЭЖХ, их антиоксидантная активность и влияние на здоровье человека (обзор) // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 6. С. 794-803. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10886>

Original article

Determination of carotenoids by HPLC, their antioxidant activity and impact on human health (review)

Alexander Ya. Yashin^{1✉}, Yakov I. Yashin¹

¹Saitegra Group of Companies, Moscow, Russian Federation, yashin@scietegra.com[✉]

Abstract. Carotenoids are compounds which are widely used in food products. About 1,100 carotenoids have been found, including 50 carotenoids found in significant amounts in food and 30 carotenoids found in blood plasma. The main methods used to determine carotenoids are HPLC methods with different detection systems. To identify carotenoids, HPLC methods with MS and MS-MS detectors are used. HPLC methods have been used in many countries of the Americas, Asia, and Europe to create databases regarding carotenoid content in food products. Due to many conjugated bonds (up to 11), carotenoids have antioxidant activity.

Astaxanthin found in red fish, red caviar, and shrimps has the highest antioxidant activity. Due to their antioxidant activity, carotenoids have significant health-improving effects. Regular consumption of carotenoids sig-



nificantly reduces the risk of the most dangerous diseases: cardiovascular diseases, oncological diseases, diabetes, etc. These diseases are responsible for the largest share of the population mortality. Carotenoids suppress oxidative stress, which commonly precedes many diseases, including the most dangerous ones. Carotenoids boost immunity and remove inflammatory processes. They are effective at curing eye and liver diseases. Carotenoids are produced globally and in large quantities. The global market is worth more than 1.5 billion dollars. They are produced in large volumes: beta-carotene, lycopene, lutein, and astaxanthin. Over 6000 scientific papers have been dedicated to the effects of carotenoids on human health.

Keywords: carotenoids, HPLC, detectors, analysis, databases, content profile, wellness effects, carotenoid market.

For citation: Yashin A.Ya., Yashin Ya.I. Determination of carotenoids by HPLC, their antioxidant activity and impact on human health (review). *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 794-803. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10886>

Введение

Происхождение слова каротиноиды (лат. Carota-морковь, греч. Eidos-вид). К настоящему времени идентифицировано около 1100 каротиноидов [1], они широко распространены в окрашенных фруктах, ягодах и овощах. Основные каротиноиды: ликопин, астаксантин, бета-каротин, лутеин имеют красные, оранжевые и желтые цвета. Каротиноиды разнообразны по структуре, по своим функциям, содержат транс- и –цис изомеры. В природе больше более устойчивых транс-изомеров. Каротиноиды классифицируются на каротины и ксантофиллы. Каротины состоят из изопреновых блоков (8 блоков), 40 углеродных атомов общей формулы $C_{40}H_{56}$. В составе каротинов содержатся только атомы Н и С. Ксантофиллы – окисленные каротины, состоят из атомов С, Н и О. Кислород входит в карбоксильные, гидроксильные, альдегидные и эпокси группы. Каротиноиды синтезируют растения, водоросли, бактерии, грибы и дрожжи. Каротиноиды находятся как в свободном виде, так и в виде гликозидов или эфиров жирных кислот. В составе каротиноидов находятся сопряженные связи до 11. По другой классификации каротиноиды различаются как ациклические, моноциклические и бициклические. В пищевых продуктах в значимых количествах присутствуют только 40 каротиноидов. В сыворотке крови обнаружено 30 каротиноидов. Каротиноиды широко используются в пищевой промышленности, сельском

хозяйстве, медицине, косметике. Ликопин может успешно заменить нитрит в колбасе и ветчине. Бета-каротины добавляются в сыры и овощные пасты, в корм кур для окраски желтков яиц, как красители в пище обозначаются Е160, ксантофиллы Е161. Каротиноиды чувствительны к свету, теплу, кислороду, кислотам и щелочам. Хранение в темноте при -20 град.

За исследования каротиноидов Карреру присуждена Нобелевская премия Области поглощения каротиноидов 400-600 нм. Глобальный рынок каротиноидов: астаксантин – 257 млн долларов, бета-каротин – 253, лутеин – 180, ликопин – 81 млн дол.

Базы данных содержания каротиноидов в пищевых продуктах в разных странах

Созданы базы данных содержания каротиноидов в пищевых продуктах в Англии, США, Финляндии, Чехии, Бразилии, Японии и в пяти Европейских странах [17-23]. Первая база данных была создана в США в 1993 г. Оценено содержание альфа- и бета-каротинов, лутеина, зеаксантина, ликопина, бета-криптоксантина в 215 пищевых продуктах (USDA data) за 1971-1991 г.г. – 10 фруктов, 23 овощей, 14 коммерческих пищевых смесей и др. продуктах. В Англии определено содержание каротиноидов только в общеупотребляемых овощах и фруктах, в Финляндии в овощах, фруктах и ягодах, в Чехии установлены общие пищевые источники каротиноидов и физиологически значимые количества для употребления,



в Бразилии создана база данных всех пищевых каротиноидов и определены факторы, влияющие на состав каротиноидов, в Японии определено содержание каротиноидов в общепотребляемых овощах, в Европе проведено сравнительное исследование потребления каротиноидов в пяти странах. Лучшие источники каротиноидов: тыква – 11.7 мг, морковь – 10.2 мг. Ликопина больше всего в томатах, абрикосах и арбузе. В Италии больше всего потребляют ликопина – 7.4 мг/день, это больше, чем в других странах: в Англии – 1.1 мг/день, в Испании – 1.6, в Австрии – 3.8, во Франции – 4.8, в Голландии – 4.9 мг/день. Содержание бета-каротина в мкг/100 г: морковь – 7975, шпинат – 4489, абрикосы – 3500, брокколи – 1580, красный перец – 1700, томаты – 603, манго – 310, апельсин – 250, арбуз – 150.

Содержание каротиноидов в диете США: бета-каротин-мкг/100 г: абрикосы сухие – 17600, морковь – 9770, свекла – 2560, брокколи – 1300, томаты – 520; ликопин-мкг/100 г: томаты (паста) – 36500, томаты (кетчуп) – 12390, томаты (сок) – 10000, сырые томаты – 3100. Определен профиль каротиноидов в желтом, фиолетовом и красном картофеле [24] и в 27 типах перца разного цвета, формы и культур [26].

Методы ВЭЖХ для определения каротиноидов в пищевых продуктах и биологических жидкостях

Каротиноиды определяют разными методами спектроскопии и методами газовой и жидкостной хроматографии. Однако, чаще всего каротиноиды анализируют методами ВЭЖХ с использованием разных детекторов, больше всего УФ и МС. В таблице 1 приведен список методов ВЭЖХ и других методов для определения каротиноидов с разными детектирующими системами. Для идентификации каротиноидов применяют 3D детекторы: масс спектрометрические, диодно-матричные и кулонометрические. Наибо-

лее чувствительные детекторы: МС, электрохимические и флуоресцентные. Электрохимический детектор в 10-100 раз чувствительнее УФ-детектора. Чувствительность флуориметрического равна электрохимическому детектору. В основном, используют обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ, в качестве сорбентов берут С18, С30, С34, фенил-гексил, фенил. Была изучена гидрофобность сорбентов и роль силанольных групп на поверхности сорбента на удерживание. Метиленовая селективность оценивалась по гомологам бензола. Элюент-метанол, ацетонитрил, вода. Изучали удерживание лутеина, ликопина и бета-каротина. Изучено влияние на удерживание плотности покрытия сорбента и длины алкильных цепей привитого слоя на сорбенте. Содержание углерода в слое для С18-2.5-20%, фенил-гексил-до 14, фенил-2.5% и С30 до 25%. Лучшее разделение-15 каротиноидов за 20 мин [37], 14 транс-изомеры. Удельная поверхность силикагеля 150-300 м²/г, размер используемых частиц 1.8-10 мкм, колонка 100x0.3 мм, 22 град., скорость 0.4 см³/мин. Метод УВЭЖХ при высоких входных давлениях за счет применения зерен размером менее 2 мкм. Скорость разделения в этом методе возрастает, высота пиков выше, т.е. чувствительность выше. Для улучшения разделения сложных смесей каротиноидов применяют двумерные методы ВЭЖХ, для разделения оптических изомеров используют хиральную хроматографию, для разделения по молекулярным массам применяют ионную, гель-фильтрационную хроматографию.

В сверхкритической флюидной хроматографии в качестве элюента используют растворитель в сверхкритическом состоянии, этот метод занимает промежуточное положение между газовой и жидкостной хроматографией. Для увеличения скорости разделения используют также пористые сорбенты. Для



Таблица 1. Методы ВЭЖХ, применяемые для определения каротиноидов с разными детектирующими системами.

Table 1. HPLC methods used to determine carotenoids with different detection systems.

Методы	Ссылки
ВЭЖХ обращенно-фазовая	45,46
ВЭЖХ ультрафиолетовый детектор	47
ВЭЖХ спектрофотометрический	48
ВЭЖХ-МС масс-спектрометрический	49,50
ВЭЖХ-МС-МС	51
ВЭЖХ-флуориметрический	52
ВЭЖХ-кулонометрический	53
ВЭЖХ-электрохимический	54
ВЭЖХ-ДМД-диодноматричный	55
ВЭЖХ-ДМД-МС	56
ВЭЖХ-ЯМР	57
Ультра ВЭЖХ	58
УВЭЖХ –УФ-МС	59
УВЭЖХ двумерная	60
Тонкослойная хроматография	61
Хиральная хроматография	62
Гель-проникающая хроматография	63
Двумерная ВЭЖХ	64
Сверхкритическая флюидная хроматография	65
Хроматография с поверхностно-пористыми сорбентами	66
Хроматография на сорбентах С34	67
Экстракция	68-74

анализа каротиноидов из пищевых продуктов часто применяют предварительную экстракцию, практически используют все виды экстракции [68-74].

Антиоксидантная активность каротиноидов [75-82]

За счет сопряженных двойных связей каротиноиды обладают антиоксидантной активностью, которая обеспечивает им оздоровительный эффект. Наибольшей антиоксидантной активностью обладает астаксантин, его антиоксидантная активность в 11 раз больше, чем у бета-каротина и еще больше, чем у альфа-токоферола (витамина Е). Однако, по антиоксидантной активности каротиноиды уступают антиоксидантам – полифенолам, в частности, флавоноидам и фенольным кислотам.

Влияние каротиноидов на здоровье человека

Регулярное потребление каротиноидов с пищевыми продуктами снижает

риск самых опасных болезней: сердечно-сосудистых, онкологических, диабета и др. [83-106] (табл. 2). Смертность населения, в основном, от этих болезней. Каротиноиды снижают риск смерти от сердечно-сосудистых болезней и рака на 25%. Кроме того, каротиноиды подавляют окислительный стресс-предшественник большинства болезней, в том числе и самых опасных [90-92]. Ликопин эффективен против синглетного кислорода. В целом, каротиноиды обеспечивают антиоксидантную защиту клеток. Каротиноиды повышают иммунитет. Альфа, бета, гамма-каротины связаны с выработкой Т-клеток и являются естественными иммуномодуляторами. Каротиноиды замедляют старение. Каротиноиды – лутеин и зеаксантин весьма эффективны при лечении глазных болезней. Каротиноиды не позволяют развиваться неалкогольному ожирению печени. Каротиноиды подавляют опасные бактерии в же

Таблица 2. Перечень болезней, для которых потребление каротиноидов снижает риск.
Table 2. List of diseases, the risk of which is reduced when carotenoids are consumed.

Болезни	Ссылки
Общие обзоры	83-89
Сердечнососудистые	90-92
Онкологические	93-96
Окислительный стресс	97, 98
Повышение иммунитета	99
Диабет	100
Глазные болезни	101
Неалкогольное ожирение печени	103
Геликобактер пилори	102
Полнота	104
Хронические болезни	105
Пигментация кожи	106

лудке Геликобактер пилори, вызывающие язву и рак желудка. По данным доктора А.Л. Мясникова 85% населения нашей страны имеют в желудке эти бактерии. Каротиноиды против ожирения, известно, что полнота – пятая причина смерти. Многие хронические болезни не развиваются при употреблении каротиноидов. Пигментные пятна на теле человека можно убрать каротиноидами. Астаксантин и ликопин от сердечно-сосудистых заболеваний, ликопин против атеросклероза. Ликопин против рака простаты, он на 19% снижает риск рака простаты. Бета-каротин имеет терапевтический эффект при раке кожи при УФ облучении. Ликопин помогает при астме. Исследования, проведенные в Японии и Канаде, установили прямую зависимость между уровнем потребления астаксантина и снижением уровня онкологических и сердечно-сосудистых болезней. Астаксантин содержится в креветках, красной рыбе и красной икре. Более 30% онкологических болезней от несбалансированного питания, в т.ч. низкого содержания каротиноидов. Обогащение рациона питания бета-каротином до 6-8 мг/день позволяют снизить риск рака легких в 2-3 раза, рака пищевода в 3 раза, рака шейки матки в 3 раза. Брюс Эймс

назвал каротиноиды витаминами долголетия, они продлевают жизнь. Кроме выше указанных болезней, каротиноиды снижают метаболический синдром, высокое давление, потеря слуха, воспалительные процессы и нарушение когнитивных функций мозга. Каротиноиды практически не токсичны при потреблении в больших количествах. Самый биодоступный – лютеин. Более 6000 работ опубликовано по влиянию каротиноидов на здоровье человека (PubMed, Scopus).

Заключение

В обзоре систематизированы сведения по анализу каротиноидов в пищевых продуктах методами ВЭЖХ, их антиоксидантной активности и влияние потребления каротиноидов на здоровье человека. Знание этих сведений, доведенное до широких кругов населения, позволит провести профилактику многих опасных болезней и улучшить здоровье и качество жизни.

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. Dejneka V.I., Dejneka L.A., Anisimovich I.P. Monografiya. Nomenklatura. Klasifikaciya. Sintez. Belgorod: IP Osnashchenko A.A. 2011. 91 p. (In Russ.)
2. Karnauhov V.N. Biologicheskie funkcii karotinoidov. M. Nauka. 1988. 240 p. (In Russ.)
3. Strauh O. Key to carotenoids 2 nd ed Birkhauser Verlag. Basel. Switzerland 1987. 29
4. Siong T.E., Lam L.C. Analysis of Carotenoids in Vegetables by HPLC. *ASEAN Food Journal*. 2019; 7(2); 91-996 p..
5. Rodriguez-Amaya D.B. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, Washington DC, 20005-5802, 64 p.
6. Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M. Harvest Plus. Handbook for carotenoids analysis. International Food Policy Research Institute. Washington D C. 2004. 58 p.
7. Vitamin A and Carotenoids: Chemistry, Analysis, Function and Effects (Food and Nutritional Components in Focus, Volume 1) 1st Edition by Victor R Preedy (Editor), Royal Society of Chemistry; 1st edition (August 30, 2012), 608 p.
8. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids. Handbook Birkhauser. Verlag. Basel. Boston. Berlin. 2012. 885 p.
9. Zepka L.Q., Jacob-Lopes E., De Rosso V.V. Progress in Carotenoid Research [Internet]. London: IntechOpen; 2018. 228 p.
10. Whitaker J. Carotenoids-Health benefits from A to Z. 2020. <https://www.healthydirections.com/articles/eye-health/the-multiple-benefits-of-carotenoids?closebox=true>
11. Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function; Stange, C., Ed.; Springer: Cham, Switzerland. 2016; 79: 454 p.
12. Rodriguez-Concepcion M., Analos J. Bonet M.I. et al. A global perspective on carotenoids-metabolism, biotechnology and benefits for nutrition and health. *Prog. Lipid. Res.* 2018; 70: 62-93.
13. Eggersdorfer M., Wyss A. Carotenoids in human nutrition and health. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018; 652: 18-26.
14. Finkel'shtejn E.I. Sovremennyye metody analiza karotinoidov (Obzor). Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2016; 50: 29-40. (In Russ.)
15. Lako J. et al. Phytochemical flavonols, carotenoids. *Food Chem.* 2007; 101: 1727-1741.
16. Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F.M. Astaxanthin. A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006; 46: 185-196.
17. Hart D.J., Scott K.J. Development and evaluation on HPLC method for the analysis of carotenoids in foods and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 1995; 54: 101-111.
18. Holden J.M., Sedridye A.L., Beecher G.R. et al. Carotenoid content of U.S foods. An update of the Database. *J. Food Comp. Anal.* 1999; 12: 169-196.
19. Heinonen M.I., Ollilainen V., Linkola E.K. et al. Carotenoids in Finnish foods. Vegetables, fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* 1989; 37: 655-699.
20. Marova L., Slovak B., Bilkova H. et al. Physiologically significant carotenoids and their common food sources in Czech population. *Chem. Papers* 1999; 53: 174-183.
21. Rodriguez-Amaya D.B. Updated Brazilian database on food carotenoids - factors affecting carotenoid composition. *J. Food Compos. Anal.* 2008; 21: 445-463.
22. Aizawa K., Inakuma T. Quantitation of carotenoids in commonly consumed vegetables in Japan. *Food Sci. Technol. Res.* 2007; 13: 247-252.
23. O'Neill H.E., Carroll Y., Corrida B. et al. European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Brit. J. Nutr.* 2001; 85: 499-507.
24. Taylor K.L., Brackenridge A.E., Vivier M.A. et al. HPLC profiling of the major carotenoids in a rhabdomyosarcoma thaliaka Ceaf. Tissue. *J. Chrom A.* 2006; 1121: 83-91.
25. Kotikova Z., Sule M., Lachman J. et



- al. Carotenoid profile and retention in yellow, purple- and red fleshed potatoes after thermal processing. *Food Chem.* 2016; 197: 992-1001.
26. Kim J.S., An C.G., Park J.S. et al. Carotenoid profiling from 27 types of paprika with different colors, shapes and cultivation methods. *Food Chem.* 2016; 201: 64-71.
27. Shintani H. HPLC Analysis of vitamin A and carotenoids. *Pharm. Anal. Acta.* 2013; 4: 218-223.
28. Butnariu M. Methods of analysis (extraction, separation, identification and quantification) of carotenoids from natural products. *J. Ecosystem Ecography.* 2016; 8: 193-210.
29. Tee E.S. The analysis of carotenoids and retinoids - a review. *Food Chem.* 1991; 41: 147-193.
30. Rodriguez-Amaya D.B. Structures and analysis of carotenoid molecules. *Sub-Cell Biochem.* 2016; 79: 71-108.
31. Amorim-Currilho K.T., Cereda A., Fente C. et al. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends Anal. Chem.* 2014; 56: 49-73.
32. Rivara S.M., Canela-Garayoa R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *J. Chrom. A.* 2012; 1224: 1-10.
33. Scott K.J. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food Chrom.* 1992; 45: 357-364.
34. van Brumen R.B. Liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 1997; 69: 2061-2066.
35. Moros E.E., Darnoko D., Cheryan M. et al. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 30: 5787-5790.
36. Dejneka V.I., Dejneka L.A. Inkrementnyj podhod v analize karotinoidov metodom OF VEZHKH. Razdelenie diefirov ksantofillov. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2006; 6(3): 366-375. (In Russ.)
37. Gupta P., Sreelakshmi Y., Sharma R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by HPLC. *Plant Methods* 2015; 11: 5-9.
38. Dejneka V.I., Podkopajlo R.V., Dejneka L.A. Sorokopudov V.N., Gostishchev I.A. Opredelenie karotinoidov plodov oblepihi metodom VEZHKH. *Nauchnye vedo-mosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2011; 15: 371-378. (In Russ.)
39. Zelenkova E.N., Egorova Z.E., Shabunya P.S., Fal'kova S.A. Analiz karotinoidov metodom VEZHKH v otdel'nyh sortah morkovi. *Vestnik MAH.* 2015; 4: 9-21. (In Russ.)
40. Kimura M. et al. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweet potato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chemistry.* 2007; 100: 1734-1746.
41. Marinova D., Ribarova F.J. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2007; 20: 370-374.
42. Pupin A.M., Dennis M.J., Toledo M.C.F. HPLC analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chem.* 1999; 64: 269-275.
43. Gleize B. et al. Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q10 and carotenoids in complex samples. *Food Chem.* 2012; 134: 2560-2564.
44. Dhankhar P., et al. Optimization of various steps for RP-HPLC determination of beta-carotene in milk fat. *Intern. Food Res J.* 2017; 24: 1393-1398.
45. Ligor M., Kovacova J., Buszewski B. Study of RP HPLC retention behaviors in analysis of carotenoids. *Chromatographia.* 2014; 77: 1147-1157.
46. Rasavi S.H., Blanchard F., Mare I. UV-HPLC-APCI-MS method for separation and identification of the carotenoids produced by *Sporobolomyces ruberrimus* H110. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 2006; 25: 32-36.
47. Barba A.O. et al. Application of a UV-VIS detection HPLC method for a rapid determination of lycopene and beta-carotene in vegetables. *Food Chemistry.* 2006; 95: 328-336.
48. Rivera S.M., Christou P. Identification of carotenoids using mass spectrometry.



Mass spect. Rev. 2014; 33: 353-372.

49. Daood H., Bencze G., Pelotos G., Pak Z. HPLC analysis of carotenoids from tomatoes using cross-linked C18 column and MS detection. *J. Chrom. Sci.* 2014; 52: 985-991.

50. Hrvalova B., Martinez-Hullamo M. et al. Development of an advanced HPLC – MS/MS method for the determination of carotenoids and fat-soluble vitamins in human plasma. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 1719-1725.

51. Bizzo H.R., Faria-Machado A.F., Guedes A.M. et al. Simultaneous determination of carotenoids and tocopherols from palm hybrid oil by HPLC with photodiode array and fluorescence detectors. *Lipids.* 1992; 27: 483-490.

52. Ferruzzi M.G., Sander L.C., Cocu C.L. et al. Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with coulometric electrochemical array. *Anal. Biochem.* 1998; 256: 74-81.

53. Gamache P., Acworth I. Measurement of dietary carotenoid isomers using HPLC-ECD. *Thermo-Fischer Scientific. Application Brief 162.* 2016; 1-4.

54. Zeb A. A simple, sensitive HPLC-DAD method for simultaneous determination of carotenoids, chlorophylls and alpha-tocopherol in leafy vegetables. *Food measure.* 2017; 11: 979-986.

55. Kurz C., Carle R., Schieber A. HPLC-DAD-MS(n) characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chem.* 2008; 110: 522-530.

56. Strohschein S., Pursch M., Handel H., Albert K. Structure elucidation of beta-carotene isomers by HPLC-NMR coupling using a C30 bonded phase. *Fres. J. Anal. Chem.* 1997; 357: 998-502.

57. Bohoyo-Gil D., Dominguez-Valhondo D. et al. UHPLC as suitable methodology for the analysis of carotenoids in food matrix. *Eur. Food Res. Technol.* 2012; 235: 1055-1061.

58. Pauni T., Fu W., Gudmundsson S. et al. Multidimensional analytical approach

based on UHPLC-UV-ion mobility MS for the screening of natural products. *Anal. Chem.* 2015; 87: 2593-2599.

59. Cacciola F., Donato P., Guiffredo D. et al. Ultra high pressure in the second dimension of a comprehensive two-dimension liquid chromatography system for carotenoid separation in red chili peppers. *J. Chrom. A.* 2012; 1255: 244-251.

60. Jeffrey S.W. An improved thin-layer chromatographic technique for marine phytoplankton pigments. *Limnol. Oceanogr.* 1981; 26: 191-197.

61. Kuregyan A.G. Izuchenie karotinoidov tykvy metodami spektrofotometrii i tonkoslojnoj hromatografii. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2015; 1-2. (In Russ.)

62. Lander W.O., Eitenmiller R.R. Application of gel permeation chromatography and nonaqueous reverse phase chromatography to high pressure liquid chromatography determination of retinyl palmitate and beta-carotene in oil and margarine. *JAOAC* 1979; 62: 283-289.

63. Donato P., Cacciola F., Mondello L. et al. Analysis of the carotenoid composition and stability in various overripe fruits by comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *LC GC Europe.* 2016; 29: 252-257.

64. Pfander H., Riesen R., Niggli U. HPLC and SFC of carotenoids-scope and limitations. *Pure Appl. Chem.* 1994; 66: 947-954.

65. Balomon M.Y., Piccoli P., Fountana A. Simultaneous determination of carotenoids with different polarities in tomato products using a C30 core-shell column based approach *Microchemical J.* 2020; 159: 105390.

66. Bell C.M., Sander L.C., Wise S.A. Temperature dependence of carotenoids on C18, C30 and C34 bonded stationary phases. *J. Chrom.* 1997; 757: 29-39.

67. Adadi P., Barakova N.V., Krivoshapkina E.F. Selected methods of extraction carotenoids, characterization and health concerns. A review. *J. Agric. Food Chem.* 2018;



66: 5925-5947.

68. Montesano D. et al. A simple and selective analytical procedure for the extraction and quantification of lutein from tomato by products by HPLC-DAD. *Food Anal. Methods*. 2012; 5: 710-715.

69. Pacheco S., Peixoto F.M., Borguini R.G. et al. Microscale extraction method for a HPLC carotenoids analysis in vegetable matrices. *Scientia Agricola*. 2014; 71: 345-355.

70. Saini R.K., Keum Y. Carotenoid extraction methods. A review of recent developments. *Food Chem*. 2018; 240: 90-103.

71. Poojary M.M., Barba F.J., Aliakbarian B. et al. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs* 2016; 14: 214-221.

72. Ganzler K., Salgo A., Valko K. Microwave extraction. A novel simple preparation method for chromatography. *J. Chrom.* 1986; 371: 299-306.

73. Petry F.C., Mercadante A.Z. New method for carotenoid extraction and analysis by HPLC-DAD-MS/MS in freeze-dried citrus and mango pulps. *J. Brasz. Chem. Soc.* 2018; 29: 205-215.

74. Palva S.A., Russell R.M. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 1999; 18: 426-433.

75. Krinsky N.I. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*. 2001; 17: 815-817.

76. Stahl W., Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspect. Med.* 2003; 24: 345-351.

77. Igielska-Kalwat J., Goscianska J., Nowak I. Carotenoids as natural antioxidants. *Postepy Hig. Med. Dosw (online)*. 2015; 69: 418-428.

78. Kiokias S., Gordon M. Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chem*. 2003; 83: 523-529.

79. Rodriguez-Amaya D.B. Quantitative analysis, in vivo assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids. A review. *J. Food Composition and Analysis*. 2010; 23: 726-740.

80. Palozza P., Krinsky N.I. Antioxidant

effects of carotenoids in vivo and in vitro. An overview. *Meth. Enzymol.* 1992; 213: 403-420.

81. Miller N.J., Sompson J., Candeias I. P. et al. Antioxidant activities of carotene and xanthophylls. *FEBS Lett.* 1996; 384: 240-242.

82. Gusman I., Vargas K., Chacon F. et al. Health-promoting carotenoids and phenolics in 31 capsicum accessions. *Amer. J. Horticultural Sci.* 2021; 56: 36-41.

83. Rao A.V., Rao L.G. Carotenoids and human health. *Pharm. Res.* 2007; 55: 207-216.

84. Krinsky N.L., Johnson E.J. Carotenoids actions and their relation to health and disease. *Mol. Asp. Med.* 2005; 26: 459-516.

85. Olson J.A. Carotenoids and human health. *Arch. Latinoaver. Nutr.* 1999; 49: 73-81.

86. Fiedor J., Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 2014; 6: 466-468.

87. Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 2004; 58: 100-110.

88. Lia Z. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Curr. Pharm. Design.* 2017; 5: 1-10.

89. Fassett R.G., Coombes J.C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules*. 2012; 17: 2030-2048.

90. Riccioni G., D Orazio N. et al. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers. *Mar. Drugs*. 2011; 9: 1166-1175.

91. Di Pietro N., Di Tomo P., Pandolf A. Carotenoids in cardiovascular disease prevention. *JSM Atheroscler.* 2016; 1: 1102-1109.

92. Tanaka T., Shinimizu M., Morivaki H. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*. 2012; 17: 3202-3242.

93. Soares N., Teodoro A.J., Cotsch P.R. et al. Anticancer properties of carotenoids in prostate cancer. A review. *Histol. Histo-pathol.* 2015; 30: 1143-1154.

94. Smith T.A.D. Carotenoids and cancer prevention and potential therapy. *Brit. J. Biomed. Sci.* 1998; 55: 265-268.



95. Collins K. Cancer reducing risk with carotenoids. *Today's dietitian*. 2019; 21: 12-21.
96. Kiokias S., Gordon M. Dietary supplementation with a natural carotenoids mixture decreases oxidative stress. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003; 57: 1135-1140.
97. Gammone M.A., Riccioni G., D Orazio N. Marine carotenoids against oxidative stress. Effects on human health. *Mar. Drugs*. 2015; 13: 6226-6246.
98. Chen B.P., Park J.S. Carotenoids action on the immune response. *J. Nutr.* 2004; 134: 257-261.
99. Sluijs I., Cadier E., Benlens J.W. et al. Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes. *J. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2015; 25: 275-282.
100. Snodderly D.M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J Clin. Nutr.* 1995; 62: 1448-1461.
101. Shidfar F., Agah S., Ekhlasi G. et al. Lycopene as adjunctive therapy for Helicobacter pylori eradication-a quasi-control trial. *J. Complement. Integr. Med.* 2012; 9: 14-21.
102. Christensen K., Lowler T., Mares J. Dietary Carotenoids and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease among US Adults, NHANES 2003-2014. *Nutrients*. 2019; 11: 1101-1108.
103. Mounien L., Tourniase F., Landrier J.F. Anti-obesity effect of carotenoids-direct impact on adipose tissue and adipose tissue-driven indirect effects. *Nutrients*. 2019; 11: 1562-1567.
104. Rao A.V., Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoids in the prevention of chronic disease. A review. *Nutr. Res.* 1999; 19: 305-323.
105. Stephen I.D., Coetzee P., Perrett D.I. Carotenoids and melanin pigment coloration affect perceived human health. *Evolution and human behavior*. 2011; 33: 216-227.

Информация об авторах / Information about the authors

Я.И. Яшин – д.х.н., профессор, научный консультант компании «Интерлаб», Москва, Россия

А.Я. Яшин – к.х.н., старший научный сотрудник ООО «Институт аналитической токсикологии», Москва, Россия

Ya.I. Yashin – Dr.Sci. (chemistry) professor, Scientific Consultant of Interlab, Moscow, Russian Federation, e-mail: yashin@scietegra.com

A.Ya. Yashin – Dr.Sci. (chemistry), Senior Researcher, Institute of Analytical Toxicology LLC, Moscow, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 13.10.2022; одобрена после рецензирования 16.11.2022; принята к публикации 23.11.2022.

The article was submitted 13.10.2022; approved after reviewing 16.11.2022; accepted for publication 23.11.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 541.1+628.16

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10887

Самоподдерживающиеся процессы умягчения-опреснения подземной солоноватой воды

Андрей Гаральдович Прудковский¹✉, Руслан Хажсетович Хамизов¹,
Ирина Владимировна Комарова¹, Надежда Константиновна Галкина¹

¹Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской Академии наук, Москва, Россия, prudkovsky@gmail.com✉

Аннотация. В работе с помощью численных экспериментов, включающих большое количество взаимосвязанных последовательных циклических процессов сорбции-регенерации на сильнокислотном катионите, смоделирована технологическая схема самоподдерживающегося процесса умягчения-опреснения многокомпонентного раствора, моделирующего состав реальной подземной солоноватой воды. Такие воды, содержащие в качестве макрокомпонентов катионы натрия, калия, кальция и магния, а также хлоридные, сульфатные и бикарбонатные анионы, распространены в природе, например, в подземных источниках Крымского полуострова. Несмотря на слабую солёность, они, тем не менее, не пригодны не только в качестве питьевой, но даже и в качестве технической для полива. В работе рассмотрен дешёвый безреагентный способ очистки подобной воды, в котором в качестве раствора для регенерации сорбционной колонны в каждом цикле используется рассол, оставшийся после опреснения. Наличие сульфатов создаёт дополнительные сложности в проведении процессов ионообменного умягчения и опреснения, так как, во-первых, в исходном растворе образуются молекулярные комплексы сернистого магния и кальция, а во-вторых, в камерах концентрирования опреснителя может происходить отложение малорастворимых солей сульфата кальция. В связи с этим возникает необходимость удаления сульфатов, что проводится с помощью нанофильтрационных мембран, задерживающих двухзарядные ионы. Концентрат после нанофильтрации может быть использован для производства удобрений, а пермеат подаётся на опреснитель. Кроме того, в работе исследованы режимы опреснения и уточнена зависимость критерия существования самоподдерживающегося процесса умягчения-опреснения от концентрации регенерационного раствора, получаемого после опреснителя.

Ключевые слова: самоподдерживающиеся процессы, умягчение, опреснение, катионит, сорбция, регенерация, стационарный режим.

Для цитирования: Прудковский А.Г., Хамизов Р.Х., Комарова И.В., Галкина Н.К. Самоподдерживающиеся процессы умягчения-опреснения подземной солоноватой воды // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 6. С. 804-815. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10887>

Original article

Self-sustaining processes for the softening and desalination of underground brackish water

Andrey G. Prudnikovsky¹✉, Ruslan Kh. Khamisov¹,
Irina V. Komarova¹, Nadezhda K. Galkina¹

¹Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation, prudkovsky@gmail.com✉

Abstract. This work describes numerical experiments involving a large number of interconnected successive cyclic sorption-regeneration processes on a strongly acidic cation exchanger. These experiments were used to develop a process flow for a self-sustaining process for the softening and desalination of a multicomponent



solution simulating the composition of real underground brackish water. Such water, whose macrocomponents include sodium, potassium, calcium, and magnesium cations, as well as chloride, sulphate, and bicarbonate anions, are common in nature, for example, in the underground springs of the Crimean peninsula. Despite their low salinity, nonetheless, they are not suitable neither for drinking, nor for irrigation. The paper considers a cheap reagent-free method for purifying such water, which uses the brine left after desalination as solution for regenerating the sorption column in each cycle. The presence of sulphates makes ion-exchange softening and desalination processes more challenging, since, firstly, molecular complexes of calcium and magnesium sulphate are formed in the initial solution, and secondly, low-soluble calcium sulphate salts can be deposited in the distiller concentrate compartments. Therefore, it is necessary to remove sulphates with the help of nanofiltration membranes that retain two-charged ions. The concentrate left after nanofiltration can be used for the production of fertilizers, while the permeate is fed to the distiller. In addition, the paper investigates desalination modes and clarifies the dependence of the presence of the self-sustaining process for softening and desalination on the concentration of the regeneration solution obtained after the distiller.

Keywords: self-sustaining processes, softening, desalination, cation exchanger, sorption, regeneration, stationary mode.

For citation: Prudnikovskiy A.G., Khamisov R.Kh., Komarova I.V., Galkina N.K. Self-sustaining processes for the softening and desalination of underground brackish water. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2022. 22(6): 804-815. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10887>

Введение

В настоящей работе на основе математического моделирования взаимосвязанных циклических ионообменных процессов исследована возможность организации стационарных самоподдерживающихся (СМП-процессов) умягчения – опреснения соленых вод. Интерес к подобным процессам связан с поиском технологических возможностей создания систем водоподготовки нового поколения, например, мобильных автономных установок или систем с высокой степенью извлечения пресной воды и концентрирования рассола [1-4]. Такой поиск практически невозможно провести с помощью обычных экспериментов, которые заняли бы много времени и привели бы к большим трудозатратам. В предыдущих наших работах, посвященных переработке морской воды [1, 2] и солоноватых подземных вод [3-5], рассмотрены фундаментальные основы самоподдерживающихся процессов с использованием катионообменников различного типа. В настоящей статье приведен расчет условий реализации СМП-процесса для реальной подземной солоноватой воды Крымского региона, состав которой представлен в таблице 1.

Из таблицы 1 следует, что концентрация сульфат ионов в солоноватой воде со-

измерима с содержанием их в рассмотренных нами ранее модельных растворах, а состав воды отличается наличием в ней катионов магния и калия, а также аниона бикарбоната. Особенность данной системы заключается в том, что в процессе сорбции наряду с присутствием в растворе ионов магния и кальция присутствуют комплексы CaSO_4 и MgSO_4 .

Такая вода с небольшой вариацией соотношения компонентов является типичной для многих подземных источников, но она напрямую не может быть использована для употребления в пищу или для полива. Важной проблемой является организация наиболее дешёвого способа очистки подобной воды, желательного, без использования вспомогательных реагентов.

На рис.1 предложена схема установки для реализации самоподдерживающегося процесса очистки подобной воды. Наличие в подобной воде заметной концентрации сульфат-ионов соизмеримой с содержанием катионов магния и кальция приводит к необходимости учитывать в расчётах существование молекулярных комплексов CaSO_4 и MgSO_4 .

Теоретическая часть

Алгоритм моделирования процессов сорбции. Все особенности современных промышленных ионообменных процессов в настоящее время реализованы в

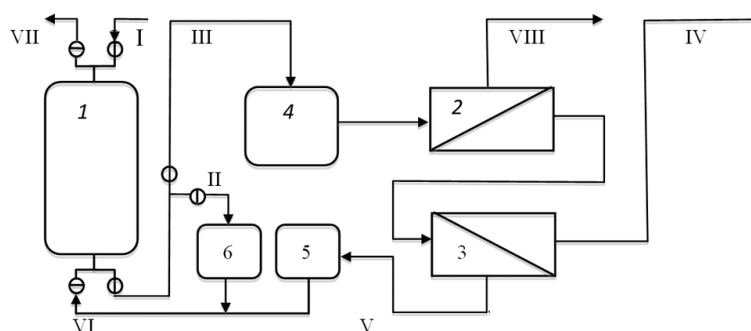


Рис. 1. Схема виртуальной установки для численных экспериментов по СМП-процессу. Модули: 1 – Na-катионирования, 2 – нанофильтрации, 3 – опреснения; 4-6 – ёмкости: 4 – умягченной воды, 5 – регенерирующего раствора, 6 – раствора, вытесняемого из слоя катионита. Потоки: I – исходная вода, II – вытесняемый из слоя раствор, III – умягченная вода, IV – опресненная вода, V – концентрат после опреснителя; VI – регенерирующий раствор, VII – сброс, VIII – концентрат нанофильтрации.

Fig. 1. Diagram of the virtual installation for numerical experiments regarding the self-sustaining process. Modules: (1) Na-cationisation, (2) nanofiltration, (3) desalination; (4-6) tanks: (4) for the tempered water, (5) for the regeneration solution, (6) for the solution forced out from the cation exchanger layer. Flows: (I) initial water, (II) solution forced out from the layer, (III) softened water, (IV) desalinated water, (V) concentrate after the destiller; (VI) regeneration solution, (VII) discharge, (VIII) nanofiltration concentrate.

Таблица 1. Состав реальной солоноватой воды
 Table 1. Composition of real brackish water

Концентрации ионов	Cl^-	SO_4^{2-}	HCO_3^-	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	K^+
моль-экв/дм ³	0.025	0.0195	0.0023	0.0431	0.0002	0.0029	0.0006
моль/дм ³	0.025	0.00975	0.0028	0.0431	0.0001	0.00145	0.0006
г/дм ³	0.886	0.936	0.168	0.9913	0.00243	0.058	0.02346

программе послойного счёта [5], которая позволяет проводить расчёты технологических циклов, состоящих из стадий сорбции, взрыхления, регенерации и отмывки на многоколоночной системе фильтров в многокомпонентных системах при переменных условиях на входе. Алгоритм расчета СМП-процессов также использует послойную модель для расчёта процесса сорбции и регенерации с определенными вариациями, показанными в работе [6]. Для послойного счёта необходимо выбрать шаг по времени Δt , определяющий величину порции, и шаг по длине колонки Δx , определяющий величину слоя из расчета установления равновесия на каждом шаге. В случае ионообменных сорбентов с сильноокислотными функциональными группами типа КУ-2 и сильноосновными группами типа

АВ-17, которые традиционно участвуют в наших модельных расчётах, процесс сорбции из слабоконцентрированных растворов как правило управляется внешней диффузией, характерное время установления равновесия можно рассчитать по формуле:

$$\Delta t = \left[0.009 \alpha \frac{v^{0.53}}{d^{1.47}} \right]^{-1} \text{ (сек)}, \quad (1)$$

где v (см/сек) = W (м³/h)/(36 · S (м²)) – линейная скорость раствора в колонне, d (см) – диаметр зерен сорбента, α – поправочный коэффициент. Так, например, произведём расчёт характерных пространственно и временных параметров Δx , Δt , необходимых для послойного счёта сорбции в колонне сечения $S=0.1964$ м², для сорбента КУ-2 при объёмной скорости раствора $W=0.98$ м³/час. Тогда линейная скорость



Таблица 2 Коэффициенты K_{Mg} и K_{Ca} образования растворимых сульфатных комплексов вида (R_mSO_4)

Table 2 K_{Mg} and K_{Ca} coefficients of the formation of soluble sulphate complexes of the (R_mSO_4) type

Катион	LgK	K^{-1} (моль)
Mg^{2+}	2.36	0.00437
Ca^{2+}	2.31	0.00490

раствора составит $v=0.138$ см/сек и, учитывая параметры КУ-2, имеем: $\alpha=0.7$; $d=0.06$; $\beta=0.1386$, $\Delta t=7.234$ сек; $\Delta x=1.0$ см.

Обмен ионов между раствором и неподвижным слоем ионообменника описывается в приближении квазистационарности:

$$\frac{a_k}{c_k} = K_k^{z_k} \left(\frac{a_{Na}}{c_{Na}} \right)^{z_k}, \quad (2)$$

где c_k , a_k – концентрации катионов в жидкой фазе и в катионите.

Уравнение электронейтральности в катионите с ёмкостью A_0 :

$$\sum_{k=1}^{kcat} z_k a_k = A_0 \quad (3)$$

Для нейтральных растворов в уравнении (3) концентрации ионов водородов и гидроксила $c_{H^+}=c_{OH^-}=10^{-7}$ (моль/дм³) можно опустить.

Уравнения для суммарной концентрации катионов Q_k в подвижной и неподвижной фазах на единицу объёма порции жидкой фазы:

$$c_k + \frac{a_k}{v_m} = Q_k \quad (4)$$

где v_m – отношение объёма порции к объёму слоя (при совпадении длины порции и длины слоя $v_m=\varepsilon$), для сорбентов КУ-2 порозность загрузки $\varepsilon=0.4$.

Из соотношений (2), (4) получаем:

$$c_k \left[1 + \frac{1}{v_m} K_k^{z_k} \left(\frac{a_{Na}}{c_{Na}} \right)^{z_k} \right] = Q_k \quad (5)$$

Система уравнений (2-4) при подстановке (5) сводится в случае катионного обмена к нелинейному уравнению относительно переменной

$$w = \frac{a_{Na}}{c_{Na}};$$

$$G(x, y) = \sum_{k=1}^{kcat} z_k \frac{y_m Q_k K_k^{z_k} w^{z_k}}{v_m + K_k^{z_k} w^{z_k}} - A_0 = 0 \quad (6)$$

Решение w нелинейного уравнения (6) в случае катионного обмена позволяет найти все концентрации веществ в подвижной и неподвижной фазе. Отмечу, что величина w чисто абстрактная вспомогательная переменная, которая работает даже в том случае, когда раствор не содержит ни ионов натрия, ни ионов хлора.

Задача, рассматриваемая в настоящей работе, не позволяет прямо использовать формулу (6) для ионного равновесия между жидкой фазой и сорбентом. Дело в том, что заданный в таблице 1 входной раствор наряду с катионами магния и кальция содержит сульфат-ионы, которые образуют молекулярные комплексы $CaSO_4$ и $MgSO_4$, которые конкурируют за катионы с катионитом. Эти комплексы довольно устойчивы, о чем свидетельствуют параметры [7], приведенные в таблице 2.

Для нахождения концентраций комплексов $CaSO_4$ и $MgSO_4$ в процессе сорбции обозначим через c_m мольную концентрацию m -ого основания (в нашем случае это концентрация в молях кальция и магния в растворе), через $x_c=c_{mSO_4}$ мольную концентрацию m -ого комплекса, а через c_{mSO_4} – мольную концентрацию сульфата в растворе. Тогда имеем:

$$\frac{x_m}{c_m^{2+} \cdot c_{SO_4}^{2-}} = K_m \text{ (1/моль)} \quad (7)$$

где $c_m^{2+}=c_m-x_m$ – мольная концентрация заряженных ионов; а $c_{SO_4}^{2-}=c_{SO_4}-\sum_m x_m$ –

мольная концентрация заряженных ионов сульфата.

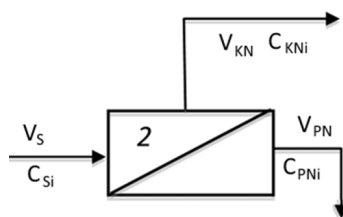


Рис. 2. Схема разделения на нанофильтрационной мембране (фрагмент 2 рис.1)

Fig. 2. Nanofiltration membrane-based separation scheme (fragment 2, Fig. 1)

Из (7) получаем систему уравнений относительно x_m :

$$x_m K_m^{-1} = (c_m - x_m) \cdot \left(c_{SO_4} - \sum_j x_j \right), \quad (8)$$

Складывая уравнения системы (8) и обозначая $z = \sum_j x_j$, получим квадратное

уравнение относительно z :

$$z K_s^{-1} = \left(\sum_m c_m - z \right) \cdot (c_{SO_4} - z), \quad (9)$$

где K_s^{-1} некоторое усреднённое значение коэффициентов K_m^{-1} , которое находится методом последовательных приближений:

$$K_s^{-1} = \frac{\sum_m K_m^{-1} x_m}{z}, \quad (10)$$

$$z = \frac{\sum_m c_m + c_{SO_4} + K_s^{-1}}{2} - \sqrt{\left(\frac{\sum_m c_m + c_{SO_4} + K_s^{-1}}{2} \right)^2 - c_{SO_4} \sum_m c_m}, \quad (11)$$

$$x_m = \frac{c_m \cdot (c_{SO_4} - z)}{K_m^{-1} + c_{SO_4} - z}, \quad (12)$$

По найденным в (12) величинам x_m находим очередное значение величины $z = \sum_j x_j$, которую снова подставляем в уравнение (9), закливая, таким образом, метод последовательных приближений для поиска решений системы уравнений (8). Цикл последовательных приближений продолжается до установления с необходимой точностью усреднённого значения коэффициента K_s^{-1} .

В нашем случае процессы сорбции и комплексообразования происходят одновременно, так что систему уравнений (8) необходимо решать совместно с системой уравнений (2-6) методом последовательных приближений: поочередно системы уравнений сорбции и комплексообразования пока значения величин комплекса $x_c = c_{mSO_4}$, а также концентрации всех анионов c_m^- , a_m^- и катионов c_m^+ , a_m^+ в растворе и на сорбенте не будут найдены с заданной точностью.

После очистки раствора на катионите от ионов кальция и магния, в умягчённой воде остаются анионы серной кислоты, которые можно отфильтровать с помощью нанофильтрационной мембраны (рис. 2).

НФ-мембрана делит первоначальный поток раствора V_S на поток концентрата V_{KN} и поток пермеата V_{PN} , проходящий сквозь нее. Потоки компонентов раствора управляются соотношениями:

$$V_S = V_{KN} + V_{PN}, \quad (13)$$

$$V_S c_{S,i}^\pm = V_{KN} c_{KN,i}^\pm + V_{PN} c_{PN,i}^\pm, \quad (14)$$

Степень концентрирования на мембране, задаётся параметром Q_N :

$$Q_N = V_{KN} / V_S, \quad (15)$$

Селективность мембраны выражается через степень удерживания заряженных ионов в безразмерных долях:

$$R_{N,i} = (c_{S,i}^\pm - c_{PN,i}^\pm) / c_{S,i}^\pm, \quad (16)$$

где $c_{S,i}^\pm$ – исходная концентрация ионов i -го компонента в умягченной воде, $c_{PN,i}^\pm$ – концентрация ионов компонента в пермеате после нанофильтрации или в виде массового коэффициента селективности:



$$R_{M,i} = \frac{c_{KN,i}^{\pm} V_{KN}}{c_{S,i}^{\pm} V_S}, \quad (17)$$

Предполагается, что негидратированные, а поэтому небольшие по размерам незаряженные комплексы $CaSO_4$ и $MgSO_4$ проходят через наночистратационную мембрану свободно.

Соотношения (13-15) позволяют связать между собой альтернативные способы задания селективности НФ-мембраны:

$$R_{M,i} = Q_N + R_{N,i} - Q_N R_{N,i} \quad (18)$$

В текущем модельном расчете для мембраны заданы следующие характеристики: $Q_N=0.192$, $R_{M,i}=0.947$, $R_{N,i}=0.935$.

С учётом высокой селективности многих НФ-мембран к двухзарядным ионам и практического отсутствия у них селективности к простым однозарядным ионам [8] для концентраций катионов и анионов, задерживаемых наномембраной (кальция, магния и сульфата), получим:

$$c_{PN,i}^{\pm} = c_{S,i}^{\pm} (1 - R_{N,i}),$$

$$c_{KN,i}^{\pm} = \frac{c_{S,i}^{\pm} V_S - c_{PN,i}^{\pm} V_{PN}}{V_{KN}} \quad (19)$$

В связи с тем, что при катионировании концентрации анионов не изменяются в умягченной воде, поступающей на мембрану, суммарная концентрация ионов кальция и магния много меньше концентрации сульфат-иона, поэтому суммарный заряд двухзарядных ионов, задержанного при фильтрации, будет отрицательным и может быть скомпенсирован только положительными ионами натрия и калия (здесь можно не делать различие между ионами натрия и калия, обозначая концентрацию их суммы, как c_{Na}). При этом следует полагать, что концентрации хлорид иона, свободно проходящих сквозь НФ-мембрану, не меняются

$c_{PN,Cl}^- = c_{KN,Cl}^- = c_{S,Cl}^- = c_{0,Cl}$. А концентрации ионов натрия (и калия), компенсирующих отрицательный заряд вещества,

задержанного мембраной и пропущенного сквозь неё, можно найти из соотношений электронейтральности:

$$c_{PN,Na}^+ = c_{S,Cl}^- + 2(c_{PN,SO_4}^- - c_{PN,Ca}^+ - c_{PN,Mg}^+),$$

$$c_{KN,Na}^+ = c_{S,Cl}^- + 2(c_{KN,SO_4}^- - c_{KN,Ca}^+ - c_{KN,Mg}^+) \quad (20)$$

В связи с наличием наночистратационной мембраны формулу для критерия $R_C = \frac{Q_R C_R}{C_{Ca}} > 1$ существования самоподдерживающегося цикла [6] следует модифицировать:

$$R_C = \frac{(1 - Q_N) Q_R C_R}{C_{Ca}} > 1, \quad (21)$$

Альтернативная формула для коэффициента R_C дана в статье [4]:

$$R_C = \frac{c_{\Sigma} - R_{M,C_0,SO_4} - Q_N c_{0,Cl} - (1 - Q_N)(1 - Q_R) c_{W,Na}}{c_{Ca}} > 1, \quad (21a)$$

где $c_{\Sigma}=0.0468$ моль-экв/дм³ – суммарная концентрация положительных (и отрицательных) ионов во входном растворе, величина Q_N , задана формулой (19) и описывает вклад НФ-мембраны, Q_R – вклад от опреснителя, C_R – концентрация регенерационного раствора. Величина Q_R согласно работе [6] выражается формулой:

$$Q_R = \frac{1 - k_W}{k_R - k_W} = \frac{C_0 - C_W}{C_R - C_W}, \quad (22)$$

В данной задаче C_0 – это сумма всех однозарядных отрицательных ионов задачи, C_W – концентрация этих ионов в очищенной воде, C_R – концентрация этих ионов в регенерационном растворе. В нашем примере, согласно таблице 1 $C_0 = c_{Cl} + c_{CO_3} = 0.025 + 0.0028 = 0.0278$ моль/дм³; $C_W = 0.005$ моль/дм³; $C_R = 1$ моль/дм³; откуда $Q_R = 0.023$. Величина Q_N является заданной характеристикой мембраны; в модельных расчётах использовалось $Q_N = 0.192$. Учитывая, что концентрация кальция $c_{Ca} = 0.0029$ моль-экв/дм³, получим в соответствии с формулой (21): $R_C = 6.4 > 1$, а по формуле (21a) получим

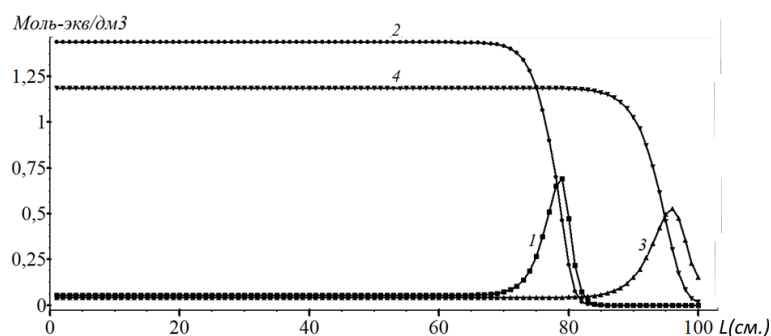


Рис. 3. Распределение компонентов по слою катионита после первой сорбции для модельных расчётов без учёта комплексообразования (1 – Mg, 2 – Ca), с учётом комплексообразования (3 – Mg, 4 – Ca).

Fig. 3. Distribution of components over the layer of cation exchanger after the first sorption for model calculations without taking into account complexation processes (1 – Mg, 2 – Ca), with taking into account complexation processes (3 – Mg, 4 – Ca).

$R_C=6.8>1$. Формулы (21) и (21a) эквивалентны, но по-разному приблизительно оценивают критерий R_C , точное значение которого можно найти по распечаткам счёта, в данной задаче это значение равно 6.5.

Формула для критерия R_A остаётся той же, что и в работе [6]:

$$R_A = \frac{A_0}{C_{Ca}} = \frac{2}{0.0029} = 690 \gg 1 \quad (23)$$

Критерий R_H найдём далее по результатам расчётов.

Численный эксперимент

Условия проведения экспериментов выбраны такие же, как при расчетах СМП-процессов для модельных растворов [4]: диаметр слоя катионита в колонне – 0.5 м (площадь сечения – 0.196 м²); высота слоя – 1 м; объем слоя сорбента – 0.196 м³; скорость пропуска раствора на стадиях сорбции – 5 колонных объемов в час (0.980 м³/час); скорость

пропускания растворов на стадиях регенерации – 1 колонный объем в час (0.196 м³/час). Коэффициенты равновесия (концентрационные константы) обмена на ион натрия:

$Na^+ - 1$; $K^+ - 1.25$; $Mg^{2+} - 1.417$; $Ca^{2+} - 1.917$.

Конец сорбционного процесса определяется по проскоку иона кальция: $c_{Ca}=0.000145$ моль/дм³. С целью оценки степени влияния сульфатных комплексов на рассматриваемый сорбционный процесс были проведены сравнительные расчёты выходной кривой сорбции без учёта образования сульфатных комплексов и с учётом.

Как следует из рис. 3, учёт комплексообразования изменяет длительность сорбции (на ~20%). С помощью рисунка 3 можно также оценить величину размытия фронта ~17 см. и критерий $R_H=6$, определяющий количество теоретических тарелок.

Таблица 3 Концентрации компонентов в (г/дм³) в растворе после отмывки и её объёмы V_o в (м³).
 Table 3 Concentrations of components (g/dm³) in the solution after washing and its volumes, V_o , (m³).

Номер цикла	Cl	SO ₄	HCO ₃	Na	Mg	Ca	K	V_o (м ³)
1	28.27	2.033	5.358	20.75	0.00061	3.46E-5	0.4296	0.09808
2	28.32	2.058	5.368	20.75	0.00630	0.00132	0.4905	0.09808
3	28.33	2.06	5.369	20.75	0.00674	0.00136	0.4989	0.09808
4	28.33	2.06	5.37	20.75	0.00676	0.00135	0.5	0.09808
5	28.33	2.06	5.37	20.75	0.00675	0.00135	0.5002	0.09808



Таблица 4. Концентрации компонентов в (г/дм³) в умягчённом растворе после сорбции и объёмы V_S в (м³).

Table 4. Concentrations of components (g/dm³) in the softened solution after sorption and its volumes, V_S , (m³).

Номер цикла	Cl	SO ₄	HCO ₃	Na	Mg	Ca	K	V _S (м ³)
0	0.8852	0.9349	0.1678	1.062	2.55E-5	1.53E-6	0.02199	74.92
1	0.8864	0.936	0.168	1.061	0.00026	5.92E-5	0.02509	76.15
2	0.8864	0.936	0.168	1.061	0.00028	6.10E-5	0.02551	76.84
3	0.8864	0.936	0.168	1.061	0.00028	6.06E-5	0.02556	76.92
4	0.8864	0.936	0.168	1.061	0.00028	6.06E-5	0.02557	76.92
5	0.8864	0.936	0.168	1.061	0.00028	6.06E-5	0.02558	76.93

Таблица 5. Концентрации компонентов в (г/дм³) в концентрате после нанофильтрации и объёмы концентрата V_{KN} в (м³).

Table 5. Concentrations of components (g/dm³) in the concentrate after nanofiltration and volumes of the concentrate, V_{KN} , (m³).

Номер цикла	Cl	SO ₄	HCO ₃	Na	Mg	Ca	K	V _{KN} (м ³)
0	0.8852	4.62	0.168	2.8	5.66E-5	3.55E-6	0.05807	14.38
1	0.8864	4.618	0.168	2.8	0.00058	0.00013	0.06621	14.62
2	0.8864	4.618	0.168	2.8	0.00062	0.00014	0.06732	14.75
3	0.8864	4.618	0.168	2.8	0.00062	0.00014	0.06747	14.76
4	0.8864	4.618	0.168	2.8	0.00062	0.00014	0.06749	14.76
5	0.8864	4.618	0.168	2.8	0.00062	0.00014	0.06749	14.76

Таблица 6. Концентрации компонентов в (г/дм³) в пермеате после нанофильтрации и объёмы пермеата V_{PN} в (м³).

Table 6. Concentrations of components (g/dm³) in the permeate after nanofiltration and volumes of the permeate, V_{PN} , (m³).

Номер цикла	Cl	SO ₄	HCO ₃	Na	Mg	Ca	K	V _{PN} (м ³)
0	0.8852	0.06084	0.1678	0.6484	1.81E-5	1.05E-6	0.01342	60.54
1	0.8864	0.06159	0.168	0.6481	0.00018	4.07E-5	0.01532	61.53
2	0.8864	0.06164	0.168	0.648	0.00019	4.19E-5	0.01558	62.09
3	0.8864	0.06164	0.168	0.6479	0.00019	4.16E-5	0.01561	62.15
4	0.8864	0.06164	0.168	0.6479	0.00019	4.16E-5	0.01562	62.16
5	0.8864	0.06164	0.168	0.6479	0.00019	4.16E-5	0.01562	62.16

Поскольку все три критерия $R_C=6.4$, $R_A=650$, $R_H=6$ более единицы, самоподдерживающийся режим возможен, что и подтверждается проделанными модельными счётами с учётом комплексообразования при концентрации регенерационного раствора $C_R=1N$. Далее, в таблицах 3-9 представлены концентрации веществ после каждого этапа процесса, а также и объёмы раствора в каждом этапе, причём, судя по таблицам, СМП-процесс устанавливается практически со второго цикла.

Обсуждение результатов

Таким образом, в результате модельного счёта нами получено, что процесс по заданной здесь схеме (рис. 1) способен функционировать в самоподдерживающемся режиме без добавления каких-либо добавочных химикатов. При этом на каждые 77.02 м³ входного раствора мы будем получать 14.76 м³ концентрата, пригодного для производства калийных удобрений, и 60.71 м³ технической воды, удовлетворяющей принятым критериям

Таблица 7. Концентрации компонентов в (г/дм³) в опреснённой воде после опреснителя и её объёмы V_W в (м³).

Table 7 Concentrations of components (g/dm³) in the desalinated water after the destiller and its volumes, V_W , (m³).

Номер цикла	Cl	SO ₄	HCO ₃	Na	Mg	Ca	K	V_W (м ³)
0	0.157	0.01078	0.02976	0.115	1.43E-6	1.20E-7	0.00238	59.13
1	0.1572	0.01092	0.0298	0.115	1.47E-5	4.65E-6	0.00271	60.1
2	0.1573	0.01093	0.02981	0.115	1.58E-5	4.79E-6	0.00276	60.64
3	0.1573	0.01093	0.02981	0.115	1.58E-5	4.77E-6	0.00277	60.71
4	0.1573	0.01093	0.02981	0.115	1.58E-5	4.76E-6	0.00277	60.71
5	0.1573	0.01093	0.02981	0.115	1.58E-5	4.76E-6	0.00277	60.71

Таблица 8. Концентрации компонентов в (г/дм³) в регенерационном растворе и её объём V_R в (м³).

Table 8. Concentrations of components in (g/dm³) in the regeneration solution and its volume, V_R , (m³).

Номер цикла	Cl	SO ₄	HCO ₃	Na	Mg	Ca	K	V_R (м ³)
0	31.4	2.158	5.952	23	0.00071	4.01E-5	0.4763	1.411
1	31.46	2.186	5.963	23	0.00738	0.00155	0.5438	1.434
2	31.47	2.188	5.965	23	0.00790	0.0016	0.553	1.446
3	31.47	2.189	5.965	23	0.00791	0.00159	0.5543	1.447
4	31.47	2.189	5.965	23	0.00791	0.00158	0.5545	1.448
5	31.47	2.189	5.965	23	0.00791	0.00158	0.5545	1.448

Таблица 9. Концентрации компонентов в (г/дм³) на выходе после регенерации и объём раствора V_V в (м³).

Table 9 Concentrations of components (g/dm³) at the outlet after regeneration and the volume of the solution, V_V , (m³).

Номер цикла	Cl	SO ₄	HCO ₃	Na	Mg	Ca	K	V_V (м ³)
0	29.49	2.081	5.59	17.95	0.1282	3.028	0.363	1.411
1	29.49	2.104	5.59	18.1	0.1133	2.914	0.4037	1.532
2	29.52	2.108	5.595	18.14	0.1144	2.892	0.4139	1.544
3	29.52	2.109	5.596	18.14	0.1145	2.889	0.4153	1.546
4	29.52	2.109	5.596	18.14	0.1145	2.889	0.4155	1.546
5	29.52	2.109	5.596	18.14	0.1145	2.889	0.4155	1.546

Таблица 10 Критерии чистой воды, а также концентрации веществ в (мг/дм³) и объёмы растворов, в стационарных циклах самоподдерживающего процесса.

Table 10 Clean water criteria, as well as concentrations of substances in (mg/dm³) and volumes of solutions, in stationary cycles of the self-sustaining process.

	Cl	SO ₄	HCO ₃	Na	Mg	Ca	K	V (м ³)
Критерии	200	500	400	200	12	20	20	-
Вход	886	936	168	991	2.43	5.8	23.46	77.02
Концентрат	886	4618	168	2802	0.62	0.14	67.49	14.76
Опреснённая вода	157	11	29.8	115	0.0016	0.00048	2.77	60.71
Выход	29520	2109	5596	18140	115	2889	416	1.55

чистоты. При этом на каждом цикле получаем полтора кубометра отходов в виде

концентрированного раствора натриевых, кальциевых и калийных солей серной и соляной кислоты (таблица 10).

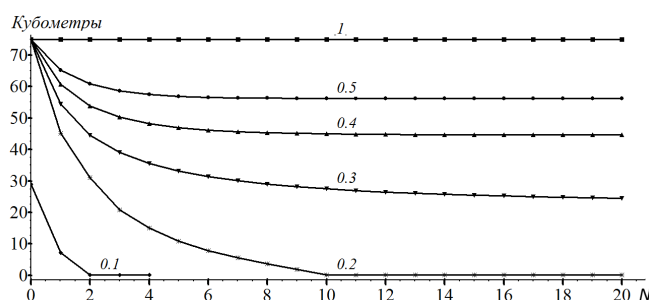


Рис. 4. Объём умягчённой воды в зависимости от концентрации регенерационного раствора $CR=(1,..,0.1)$ (моль/дм³), N – номера циклов.

Fig. 4. The volume of softened water depending on the concentration of the regeneration solution $CR=(1,..,0.1)$ (mol/dm³), N is the number of cycles.

Таблица 11. Регенерация колонны, равномерно заполненной кальцием, регенерационным раствором с концентрацией C_R (моль-экв/дм³); $V_R(C_R)$ (м³) – необходимый объём регенерации до проскока кальция 0.0001 (моль/дм³), $V_{RL}(Y)$ (м³) – линейная по Y^{-1} аппроксимация регенерационного объёма, $K_R(Y)$ – поправочный коэффициент для критерия R_C .

Table 11. Regeneration of the column filled uniformly with calcium, regeneration solution with a concentration of C_R (mol-eq/dm³); $V_R(C_R)$ (m³) is the required regeneration volume before calcium slip equal to 0.0001 (mol/dm³), $V_{RL}(Y)$ (m³) is linear approximation of the regeneration volume by Y^{-1} ; $K_R(Y)$ is the correction factor for the R_C criterion.

C_R	$Y = C_R/A_0$	V_R	V_{RL}	V_{RL}/V_R	$K_R = 0.88Y + 0.12$	R_C	$K_R * R_C$
2.0	1	1.6	1.6	1	1	6.4	6.4
1.5	0.75	2.7	2.1	0.8	0.78	6.4	5
1.0	0.5	5.35	3.2	0.6	0.56	6.4	3.6
0.5	0.25	17.9	6.4	0.36	0.34	6.4	2.2
0.4	0.2	26	8	0.3	0.3	6.4	1.9
0.3	0.15	42	10.7	0.25	0.25	6.5	1.6
0.2	0.1	80	16	0.2	0.2	6.5	1.3

Заметим, что результаты СМП-процесса зависят от концентрации регенерационного раствора C_R определяемой режимом работы опреснителя. Проведём модельный эксперимент для исследования процесса при уменьшении величины C_R . Как следует из модельных расчётов, объём умягчённой воды в СМП-процессе уменьшается с уменьшением величины C_R , а при $C_R < 0.3$ и вовсе происходит срыв (рис. 4).

Отметим, что критерий R_C , который определяет режим регенерации и должен реагировать на подобное поведение процесса остаётся при этом практически неизменным (см. таблицу 11), откуда следует, что формула (21), созданная для нахождения R_C для концентрированных регенерационных растворов $C_R > 1$ нуждается в серьёзной доработке для слабых концентраций $C_R < 1$. Причина ошибок

формулы (21) состоит в том, что она основана на линейной зависимости необходимого объёма регенерационного раствора от величины C_R^{-1} , а сорбционные формулы (2-6) для разнозарядных ионов Са и На – нелинейны, что и проявляется при малых концентрациях C_R .

Для нахождения поправочного коэффициента K_R для критерия R_C при $C_R < A_0$ проведём модельный эксперимент по регенерации нашей колонны, первоначально равномерно заполненной ионами кальция. Окончание регенерации зададим по проскоковой концентрации иона кальция $c_{Ca} < 0.0001$ (моль/дм³). Результаты эксперимента – объёмы регенерационного раствора $V_R(C_R)$, приведены в таблице 11. Для сравнения линейная зависимость $V_{RL}(Y)$, где $Y = C_R/A_0$, также дана в таблице 11. Искомый коэффициент K_R за-

даём в виде отношения $V_{RL}(Y)/V_R(C_R)$, которое можно с достаточной точностью аппроксимировать формулой:

$$K_R = 0.88Y + 0.12 \quad (24)$$

Модифицированный таким образом критерий $K_R R_C$, как и положено, уменьшается с уменьшением значения Y , а при $K_R(Y) \cdot R_C < 1.6$ происходит срыв СМП-процесса.

Заключение

Проведенные численные эксперименты очистки солоноватой воды и анализ полученных результатов показывает осуществимость на практике стационарного циклического самоподдерживающегося процесса умягчения-опреснения солоноватой воды с использованием сильнокислотного катионита, в котором регенерация катионита в каждом цикле осуществляется только за счет возвратного рассола, получаемого при опреснении умягченной воды.

Это дает возможность создания систем водоподготовки при СМП переработке

солоноватой воды, не требующих привозных реагентов и, соответственно, устройств хранения реагентов и приготовления регенерационных растворов.

На характеристики самоподдерживающихся процессов, а именно, количество циклов до выхода на стационарный режим, а также продолжительность этих циклов на стадиях сорбции и регенерации, оказывают влияние два взаимосвязанных фактора: суммарная концентрация и степень концентрирования рассола.

Рассчитанная величина критерия подтверждает надежность самоподдерживающегося процесса переработки солоноватой воды, что было показано приведенными выше результатами расчета в виде таблиц и рисунков.

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

1. Muraviev D.N., Khamizov R.Kh., Tikhonov N.A., J. Gómez Morales, Clean ("Green") Ion Exchange Technologies. IV. Development of Sorbent for Self-sustaining Decalcification of Mineralized Waters // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2004, Vol. 43, no. 8. P. 1868-1874.
2. Tokmachev M.G. Tikhonov N.A., Khamizov R.Kh., Investigation of cyclic self-sustaining ion exchange process for softening water solutions on the basis of mathematical modeling // *React. Funct. Polym.* 2008. Vol. 68, no. 8, P. 1245-1252.
3. Хамизов Р.Х., Комарова И.В., Галкина Н.К., Прудковский А.Г. Самоподдерживающиеся процессы умягчения-опреснения воды. простые двухкомпонентные системы // *Теоретические основы химической технологии.* 2020. Т.54, №5. С. 649-660.
4. Хамизов Р.Х., Комарова И.В., Галкина Н.К., Прудковский А.Г. Самоподдерживающиеся процессы умягчения-опреснения

воды. Хлоридно-сульфатные системы // *Теоретические основы химической технологии.* 2022. Т.56, №2. С. 183-196

5. Комарова И.В., Галкина Н.К., Прудковский А.Г., Хамизов Р.Х. Математическое моделирование и расчет процесса деминерализации воды в промышленном фильтре. Сообщение 1. Гидродинамика регенерации и отмывки промышленного фильтра // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2017. Т.17, №1. С.10-19.

6. Прудковский А.Г., Хамизов Р.Х., Комарова И.В. Критерии существования самоподдерживающихся процессов умягчения и опреснения воды для простой двухкомпонентной системы // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2022. Т. 22, № 4. С. 377-385.

7. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1971, 261 с.

8. Amir Abbas Izadpanah, Asghar Javidnia. The Ability of a Nanofiltration Membrane to Remove Hardness and Ions from Diluted Seawater // *Water.* 2012. Vol.4. P.283-294.



References

1. Muraviev D.N., Khamizov R.Kh., Tikhonov N.A., J. Gómez Morales. Clean ("Green") Ion Exchange Technologies. IV. Development of Sorbent for Self-sustaining Decalcification of Mineralized Waters. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2004; 43(8); 1868-1874.
2. Tokmachev M.G. Tikhonov N.A., Khamizov R.Kh. Investigation of cyclic self-sustaining ion exchange process for softening water solutions on the basis of mathematical modeling. *React. Funct. Polym.* 2008; 68(8): 1245-1252.
3. Khamizov R.Kh., Komarova I.V., Galkina N.K., Prudkovskii A.G. Self-Sustaining Processes of Water Softening and Desalination: Simple Two-Component Systems. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering.* 2020; 54(5): 919-930. (In Russ.)
4. Khamizov R. Kh., Komarova I.V., Galkina N.K., Prudkovskii A.G. Self-Sustaining Water Softening-Desalination Processes: Chloride-Sulfate Systems. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering.* 2022; 56(2): 186-199. (In Russ.)
5. Komarova I.V., Galkina N.K., Prudkovskii A.G., Khamizov R.Kh. Mathematical simulation and calculation of the process of water demineralization in industrial filter part 1. Hydrodynamics of regeneration and washing of industrial filter. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie Protsessy*, 2017; 17(1): 10-19. (In Russ.)
6. Prudkovskii A.G., Khamizov R.Kh., Komarova I.V. Existence criteria for self-sustaining processes of water softening and desalination for simple two-component system. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie Protsessy.* 2022; 22(4): 377-385. <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2022.22/10564> (In Russ.)
7. Lurie Y.Y. Handbook of analytical chemistry. M., Chemistry, 1971. 261 p. (In Russ.)
8. Amir Abbas Izadpanah, Asghar Javidnia. The Ability of a Nanofiltration Membrane to Remove Hardness and Ions from Diluted Seawater. *Water.* 2012; 4: 283-294.

Информация об авторах / Information about the authors

А.Г. Прудковский – д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория сорбционных методов, ГЕОХИ РАН, Москва, Россия

Р.Х. Хамизов – д.х.н., чл.корр. РАН, и.о. директора ГЕОХИ РАН, зав. лабораторией сорбционных методов, ГЕОХИ РАН, Москва, Россия

И.В. Комарова – к.х.н., старший научный сотрудник, лаборатория сорбционных методов, ГЕОХИ РАН, Москва, Россия

Н.К. Галкина – к.х.н., старший научный сотрудник, лаборатория сорбционных методов, ГЕОХИ РАН, Москва, Россия

A.G. Prudkovskii – Dr.Sci. (Phys/Math.), Leading researcher, Lab of Sorption Methods, GEOKHI RAS, Moscow, Russian Federation, e-mail: prudkovsky@gmail.com

R.Kh. Khamizov – Dr.Sci.(Chem), Correspondent member of RAS, Acting Director of GEOKHI RAS, Head of the Laboratory of Sorption Methods, GEOKHI RAS, Moscow, Russian Federation, e-mail: khamiz@mail.ru

I.V. Komarova – Ph.D. (Chem.), Senior researcher, Lab of Sorption Methods, GEOKHI RAS, Moscow, Russian Federation, e-mail: ivk.geohi@gmail.com

N.K. Galkina – Ph.D. (Chem.), Senior researcher, Lab. of Sorption Methods, GEOKHI RAS, Moscow, Russian Federation, e-mail: nkgaikina@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 14.10.2022; одобрена после рецензирования 16.11.2022; принята к публикации 23.11.2022.

The article was submitted 14.10.2022; approved after reviewing 16.11.2022; accepted for publication 23.11.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10888

ВЭЖХ-МС/МС определение амоксициллина в плазме крови с использованием дериватизации

Елизавета Николаевна Гончарова¹✉, Диана Эльмировна Габидуллина¹,
Ренат Наилевич Селимов¹, Павел Анатольевич Коряковцев¹,
Юлия Валерьевна Карсакова¹, Сергей Владимирович Козлов¹,
Александр Анатольевич Комаров^{1,2}, Екатерина Сергеевна Енгашева¹,
Сергей Владимирович Енгашев¹, Борис Вениаминович Уша²,
Игорь Геннадьевич Гламаздин², Дамир Исмаилович Удавлиев²

¹НВЦ Агроветзащита, Москва, Россия, goncharova.betty@ya.ru✉

²Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

Аннотация. Амоксициллин (АМОХ) является широко применяемым антибиотиком, как в медицине, так и ветеринарии, поэтому задача его надежного определения в биологических матрицах, таких как, например, плазма крови остается актуальной. АМОХ является нестабильным аналитом, на его деградацию в растворах и матрицах оказывают влияние множество параметров: температура, природа растворителя, pH среды, добавление солей или кислот в экстракты. Эти факторы усложняют пробоподготовку и количественное определение амоксициллина в сложных матрицах, так как при фармакокинетическом исследовании большого числа проб или длительном анализе стабильность аналита играет немаловажную роль. Разработанная методика позволяет надежно определять амоксициллин в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС, за счет повышения его стабильности в экстрактах плазмы крови и увеличении времени удерживания на обращенно-фазных сорбентах путем дериватизации вторичным циклическим амином – пирролидином. При разработке методики рассматривали влияние многих факторов на полноту дериватизации и извлечения. Для этого варьировали pH экстрагирующего фосфатного буфера, добавляемый объем пирролидина, время дериватизации и pH экстракта перед его очисткой с помощью твердофазной экстракции. Условия методики были оптимизированы так, чтобы достичь хорошего извлечения – не ниже 80%. При ВЭЖХ-МС/МС анализе детектируемым веществом является дериват, который имеет молярную массу 436 г/моль. Конечный аналит детектируется в отрицательном режиме ионизации с m/z 435.3, при фрагментировании дает ионы-продукты с m/z 263.1; 357.2 и 340.1. Дериватизация позволила улучшить удерживание определяемого аналита на обращенно-фазовом сорбенте. Хроматографическое разделение при этом занимает 9 минут и проходит в градиентном режиме элюирования. При этом известно, что сам амоксициллин в экстрактах плазмы крови в автосамплере в течение суток деградирует более чем на 20%, его дериват в этих условиях остается стабильным.

Ключевые слова: амоксициллин, плазма крови, ВЭЖХ-МС/МС, дериватизация.

Благодарности: соглашение между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России) и ООО «НВЦ Агроветзащита С-П.» о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации российской образовательной организации высшего образования и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства «Разработка инновационных средств защиты здоровья сельскохозяйственных животных и внедрение их в производство», выполняемого с участием Московского государственного университета пищевых производств (ФГБОУ ВО «МГУПП») от 14 декабря 2020 г. № 075-11-2020-033.

Для цитирования: Гончарова Е.Н., Габидуллина Д.Э., Селимов Р.Н., Коряковцев П.А., Карсакова Ю.В., Козлов С.В., Комаров А.А., Енгашева Е.С., Енгашев С.В., Уша Б.В., Гламаздин И.Г., Удавлиев Д.И. ВЭЖХ-МС/МС определение амоксициллина в плазме крови с использованием дериватизации // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 6. С. 816-828. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10888>



Original article

HPLC-MS/MS determination of amoxicillin in blood plasma using derivatization

Elizaveta N. Goncharova¹✉, Diana E. Gabidullina¹, Renat N. Selimov¹, Pavel A. Koryakovtsev¹, Yulia V. Karsakova¹, Sergey V. Kozlov¹, Alexander A. Komarov^{1,2}, Ekaterina S. Engasheva¹, Sergey V. Engashev¹, Boris V. Usha², Igor G. Glamazdin², Damir I. Udavliev²

¹NVC Agrovetzashita, Moscow, Russian Federation, goncharova.betty@ya.ru✉

²Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

Abstract. Amoxicillin (AMOX) is an antibiotic widely used both in general medicine and veterinary medicine that is why it is very important to enable its reliable determination in biological matrices, such as blood plasma. AMOX is an unstable analyte, its degradation in solutions and matrices is influenced by many parameters: temperature, the nature of the solvent, the pH of the medium, salts or acids added to the extracts. These factors impair sample preparation and the quantification of amoxicillin in complex matrices since analyte stability plays an important role in the pharmacokinetic study of a large number of samples or a long-term analysis. The developed method allows reliably determining amoxicillin in blood plasma by HPLC-MS/MS. It involves increasing amoxicillin stability in blood plasma extracts and increasing the retention time on reverse-phase sorbents by derivatisation with a secondary cyclic amine (pyrrolidine). The developed methodology considers the influence of many factors on the completeness of derivatisation and extraction. For this, we varied the pH of the extracting phosphate buffer, the added volume of pyrrolidine, the derivatisation time, and the pH of the extract before it was purified by solid-phase extraction. The method's conditions were optimised to achieve a good recovery of at least 80%. During HPLC-MS/MS analysis, the detectable substance was a derivative, with a molar mass of 436 g/mol. The final analyte was detected in the negative ionisation mode with $m/z=435.3$, during fragmentation it produced product ions with $m/z=263.1$, 357.2, and 340.1. Derivatisation allowed improving the retention of the determined analyte on the reverse-phase sorbent. Chromatographic separation took 9 minutes and took place in a gradient elution mode. At the same time, amoxicillin in blood plasma extracts in the autosampler degraded by more than 20% in 24 hours and its derivative remained stable under these conditions.

Keywords: amoxicillin, blood plasma, HPLC-MS/MS, derivatisation.

Acknowledgments: agreement between the Ministry of Education and Science of the Russian Federation and OOO NVC Agrovetzashita S-P on providing subsidies from the federal budget to develop cooperation between a Russian educational organisation of higher education and an organisation of the real sector of the economy in order to implement a comprehensive project to create high-tech production “Development of innovative means of protecting the health of farm animals and their introduction into the production” carried out with the participation of Moscow State University of Food Production of 14 December 2020 No. 075-11-2020-033.

For citation: Goncharova E.N., Gabidullina D.E., Selimov R.N., Koryakovtsev P.A., Karsakova Yu.V., Kozlov S.V., Komarov A.A., Engasheva E.S., Engashev S.V., Usha B.V., Glamazdin I.G., Udavliev D.I. HPLC-MS/MS determination of amoxicillin in blood plasma using derivatisation. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 816-828. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10888>

Введение

Амоксициллин (АМОХ) – полусинтетический антибиотик группы пенициллинов, обладающий широким спектром антимикробного действия, активный в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [1, 2]. АМОХ нашел широкое применение

как для лечения людей, так и животных, поэтому актуальна задача его контроля в различных биологических матрицах. В литературе описаны многие способы анализа амоксициллина в плазме крови, молоке, яйцах, в тканях и органах животных [3-14]. АМОХ является нестабильным аналитом, на его деградацию в растворах

и матрицах оказывают влияние множество параметров: температура, природа растворителя, pH среды, добавление солей или кислот в экстракты [15-20]. Эти факторы усложняют пробоподготовку и количественное определение амоксициллина в сложных матрицах, так как при фармакокинетическом исследовании большого числа проб или длительном анализе стабильность аналита играет немаловажную роль.

Помимо нестабильности аналита в пробах и экстрактах, его определение с помощью жидкостной хроматографии затрудняет тот факт, что АМОХ является полярным соединением. Это влияет на выбор неподвижной фазы, так как из-за низкого сродства к неполярным фазам (C18, C8) амоксициллин плохо удерживается на сорбенте и выходит из колонки с мертвым объемом [18, 21]. Использование обращенно-фазовой хроматографии ограничивается еще и тем, что основным элюентом в данном методе является метанол, с которым амоксициллин образует аддукт [22]. Взаимодействие с метанолом с образованием эфиров [23] является общим свойством пенициллинов, что также ограничивает возможность применения метанола при подготовке проб, так как это ведет к потере целевых соединений. В нескольких работах, ввиду нестабильно-

сти амоксициллина, применяется быстрая пробоподготовка образцов с использованием ацетонитрила [24] или буфера дигидрофосфата калия [25] в качестве экстрагента, который используют для анализа без последующей очистки.

Для определения на спектральных детекторах и стабилизации бета-лактамных антибиотиков проводят дериватизацию, например, используя уксусный ангидрид и 1-метилимидазол с хлоридом ртути [26], формальдегид с трихлоруксусной кислотой [27], бензойный ангидрид с последующей обработкой экстракта 1,2,4-триазолом и хлоридом ртути (II) [28]. В статье [16] проводят дериватизацию амоксициллина с помощью пиперидина и определяют его в органах и тканях животных. Во всем мире пиперидин относится к прекурсорам наркотических веществ [29], и его оборот на территории РФ находится под серьезными ограничениями [30]. В нашей работе был разработан метод дериватизации амоксициллина в плазме крови животных, основанный на его взаимодействии с пирролидином, как вторичным амином, который не является прекурсором. Полученный дериват стабилен во время пробоподготовки в органических растворителях, в конечном экстракте и удерживается на обращенно-фазовом сорбенте (рис. 1). Разработанная методика может широко использоваться

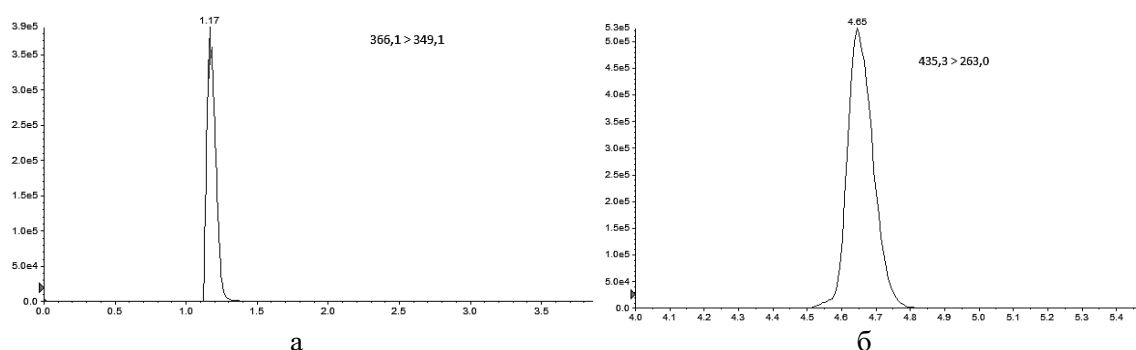


Рис. 1. Хроматограмма амоксициллина (100 нг/см³, а) и деривата амоксициллина пирролидином (100 нг/см³, б) на колонке C18. Фаза А 0.5% муравьиная кислота в воде, фаза Б 0.5% муравьиная кислота в метаноле.

Fig. 1. Chromatogram of amoxicillin (100 ng/cm³, a) and pyrrolidine derivative of amoxicillin (100 ng/cm³, b) on a C18 column. Phase A: 0.5% formic acid in water, phase B: 0.5% formic acid in methanol.



для биоаналитических и фармакокинетических исследований, в том числе при работе с большим количеством проб.

Экспериментальная часть

Материалы и реагенты. Аналитический стандарт амоксициллина тригидрата был получен от LGC (Великобритания), внутренний стандарт амоксициллина-Д4 (АМОХ-Д4) от TRC (Канада). В работе также использовали муравьиную кислоту с чистотой 98% (Scharlau, Испания), уксусную кислоту с чистотой 99.8% (Carl Roth, Германия), метанол для ВЭЖХ с чистотой 99.0%, пирролидин с чистотой 99% (ПраймКемикалсГрупп, Россия), натрий фосфорно-кислый 2-замещенный 12-водный с чистотой 98% (РусХим, Россия), соляную кислоту с содержанием 36.9% (Сигма Тек, Россия), ацетат аммония для ВЭЖХ-МС (Scharlau, Испания), ацетонитрил с чистотой 99.0%, деионизованную воду, полученную с помощью системы очистки воды Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA), ортофосфорную кислоту 85% (Scharlau, Испания), гидроксид натрия с чистотой не менее 99% (Экос.1, Россия), картриджи Sorurge C18 (Biosomma, Китай).

ВЭЖХ-МС/МС анализ. Для определения использовали жидкостной хроматограф с гибридным масс-спектрометрическим детектором QTRAP 5500 (Sciex, США), объединяющим в себе возможности тройного квадруполя и линейной ионной ловушки с ионизацией электро-распылением. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращено-фазовым сорбентом Synergi Fusion-RP (50 мм x 2 мм; 4 мкм, Phenomenex, США) с использованием предколонки SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC C18 2.1 мм (Phenomenex, США). В качестве подвижной фазы А использовали 0.5% раствор муравьиной кислоты в воде, в качестве подвижной фазы В – 0.5% раствора муравьиной кислоты в метаноле. Разделение осуществляли в градиентном

режиме элюирования. Программа градиентного элюирования для амоксициллина и его деривата была одинаковая. Время анализа занимало 9 минут, с 0 до 0.4 минут содержание фазы Б было 0%, с 0.4 до 4.2 минут содержание фазы увеличивалось с 0 до 100% и держалось на этом значении 2 минуты, далее с 6.21 минуты в течение 2.79 минут колонку уравнивали 100% подвижной фазой А. Температура термостата колонки при анализе составляла 30°C, скорость потока 0.2 см³/мин. Объем инъекции 5 мм³.

Параметры настройки масс-спектрометра использовали рекомендуемые производителем: давление газа завесы (CUR) 20 рсі, напряжение на интерфейсе (IS) - 4500 В, температура интерфейса (TEM) 400°C, давление газа-распылителя (GS1) 40 рсі, давление газа-осушителя (GS2) 40 рсі. Детектирование аналитов проводили методом MRM. Параметры масс-спектрометра приведены в таблице 1.

Растворы стандартных образцов. Исходные растворы внешнего и внутреннего стандартов с концентрацией 1 мг/см³ готовили растворением точной навески в деионизованной воде. Для предотвращения деградации амоксициллина при многократных циклах разморозки и заморозки исходного раствора, раствор внешнего стандарта (1 мг/см³) разливали по 50 мм³ в эппендорфы, из которых в дальнейшем в день использования последовательным разбавлением деионизованной водой готовили рабочие растворы с концентрацией 10 и 1 мкг/см³. Из исходного раствора внутреннего стандарта готовили рабочие растворы с концентрациями 10 и 1 мкг/см³. Приготовленные исходные растворы хранили в течение месяца при температуре -80°C для минимизации деградации.

Дериватизация амоксициллина. Дериватизацию амоксициллина проводили пирролидином, опираясь на метод, описанный в статье [16]. Для этого отбирали точную навеску аналита от 2 до 7 мг, до

Таблица 1. Параметры настройки масс-спектрометра QTRAP 5500 (DP – потенциал декластеризации, CE – энергия соударения, CXP – потенциал на выходе из ячейки соударения) при определении амоксициллина и его деривата.

Table 1. Settings of the QTRAP 5500 mass spectrometer ((DP) declustering potential, (CE) collision energy, (CXP) collision cell exit potential when determining amoxicillin and its derivative.

Вещество	Ион пре-курсор, m/z	Полярность	Ион продукт, m/z	DP, V	CE, V	CXP, V
Амоксициллин	366.1	+	349.1*	50	15	19
			208.1	50	21	19
Амоксициллин дериват	435.3	–	263.0*	-40	-30	-19
			357.1	-40	-20	-19
			340.1	-40	-25	-19
Амоксициллин-Д4 дериват	439.3	–	263.0*	-40	-30	-19
			361.1	-40	-20	-19

* - наиболее интенсивный MRM-переход, использующийся для количественного определения.

бавляли 1 см³ воды и 20 мм³ пирролидина. После полного растворения амоксициллина полученную смесь оставляли при перемешивании на 30 минут. Затем для доведения pH раствора до нейтрального добавляли 180 мм³ 1М уксусной кислоты. К полученному раствору деривата амоксициллина добавляли 25мМ ацетат аммония в воде до получения концентрации эквивалентной 1 мг/см³ исходного амоксициллина. Доведение pH раствора до нейтрального позволяет использовать полученный стандарт для приготовления конечных экстрактов плазмы крови с добавкой деривата, чтобы вычислять извлечение аналита. Для контроля полноты проведения реакции анализировали полученный стандарт с помощью ВЭЖХ-МС/МС, детектируя MRM-переходы для самого амоксициллина и его деривата. Дериват внутреннего стандарта готовили аналогичным способом, используя амоксициллин-Д4.

Пробоподготовка плазмы крови. Отбирали 0.3 см³ образца плазмы крови в пробирку. Вносили 100 мм³ раствора внутреннего стандарта амоксициллина-Д4 (1 мкг/см³) и 3 см³ раствора фосфатного буфера (100 мМ Na₂HPO₄, pH 7) и перемешивали 5 минут. В пробирку добавляли 50 мм³ пирролидина и проводили дериватизацию в течение 30 минут при

перемешивании. pH полученного экстракта довели до 3, добавлением 2М HCl (pH контролировали индикаторной лакмусовой бумагой). Перемешивали содержимое пробирки 5 минут и центрифугировали 10 минут при 4500 об/мин. Супернатант очищали с помощью твердофазной экстракции. Для этого использовали картриджи с сорбентом C18 (200 мг), предварительно последовательно промытые 3 см³ метанола и 3 см³ воды. После нанесения анализируемого образца картридж промыли 6 см³ деионизованной воды и сушили. Далее элюировали анализируемое вещество 3 см³ метанола. Элюат упаривали в токе азота при 40°C досуха. После упаривания сухой остаток перерастворяли в 1 см³ деионизованной воды. Полученный экстракт использовали для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Обсуждение результатов

Реакция дериватизации. Для дериватизации амоксициллина используется пирролидин, схема реакции приведена на рисунке 2. Данная реакция проходит в щелочной среде, которую пирролидин образует в водном растворе. Реакция проходит количественно, аналогичным образом дериватизации подвергается внутренний стандарт. При ВЭЖХ-МС/МС анализе детектируемым веществом является дериват, который имеет молярную

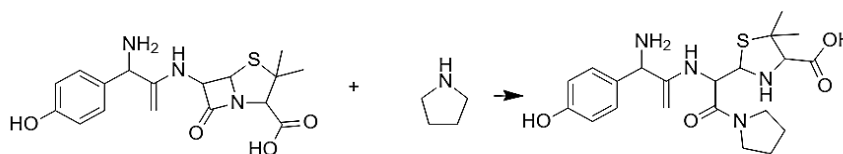


Рис. 2. Схема реакции дериватизации амоксициллина пирролидином.
 Fig. 2. Scheme of the reaction of amoxicillin derivatisation with pyrrolidine.

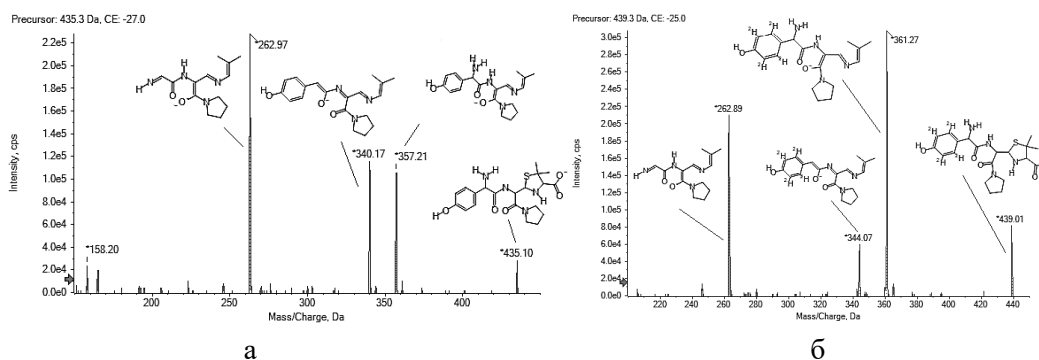


Рис. 3. Спектры МС/МС фрагментации продукта дериватизации амоксициллина (а) и амоксициллина-Д4 (б) с пирролидином в отрицательном режиме регистрации ионов.
 Fig. 3. MS/MS spectra of the fragmentation of the product of amoxicillin (a) and amoxicillin-D4 (b) derivatisation with pyrrolidine in the mode of registering negative ions.

массу 436 г/моль. Спектр продукта реакции дериватизации амоксициллина с пирролидином представлен на рисунке 3. Конечный аналит детектируется в отрицательном режиме ионизации с m/z 435.3, при фрагментировании дает ионы-продукты с m/z 263.1; 357.2 и 340.1.

Стабильность деривата амоксициллина при упаривании. Пробоподготовка таких сложных матриц как сыворотка или плазма крови часто подразумевает использование упаривания до или после ТФЭ. Поэтому изучали стабильность деривата амоксициллина при упаривании 1 см³ раствора с концентрацией аналита 100 нг/см³ в ацетонитриле в токе азота при комнатной температуре, при 30°C и при 40°C, упаривание проводилось досуха и до 100 мм³. После чего сухой остаток перерастворяли в 1 см³ деионизованной воды, концентрат доводили до 1 см³ деионизованной водой. В таблице 2 представлены результаты относительно исходных растворов (100 нг/см³). При упаривании при различных температурах и до различного объема конечного концен-

трата. Дериват оказался стабилен, поэтому при пробоподготовке для быстрого и удобного упаривания элюата после ТФЭ был выбран вариант, когда упаривание ведется досуха при 40°C.

Стабильность деривата амоксициллина в автосамплере. Известно, что амоксициллин в метанольных [31] и водных [27] растворах при комнатной температуре не стабилен. Важно было оценить стабильность полученного деривата в различных растворителях. Стабильность в автосамплере была изучена на уровне 50 нг/см³ в воде, 50% ацетонитриле, метаноле и на уровнях 10 и 1000 нг/см³ в экстракте плазмы крови (НПКО и ВПКО). Стабильность в растворителях и экстрактах рассчитывали, сравнивая абсолютные значения площадей пика в начале анализа и через 24 ч. Дополнительно изучали стабильность в экстрактах плазмы крови, которая нормировалась на внутренний стандарт. Для этого в экстрактах плазмы рассчитывали концентрации, которые рассчитывались по матричной градуировке, нормированной на внутренний

Таблица 2. Результаты исследования стабильности деривата амоксициллина при упаривании 1 см³ раствора (100 нг/см³ ацетонитрила) при различных температурах и до разного конечного объема раствора после упаривания относительного исходного раствора (n=4±SD).
 Table 2. Results of the study of the stability of amoxicillin derivative during evaporation of a 1 cm³ of solution (100 ng/cm³ of acetonitrile) at different temperatures and up to different final volumes of the solution after evaporation relative to the initial solution (n=4±SD).

Т упаривания	R, %	
	Досуха	До 100 мм ³
комнатная	94.5±1.5	95.0±1.7
30°C	96.2±1.9	95.9±2.4
40°C	96.9±1.9	96.1±1.5

Таблица 3. Изучение стабильности деривата в течение суток в автосамплере на уровне 50 нг/см³ в воде, 50% ацетонитриле, метаноле и в экстракте плазмы крови на уровнях 10 и 1000 нг/см³ (n=3±SD).

Table 3. Study of the derivative stability during the day in an autosampler at the level of 50 ng/cm³ in water, 50% acetonitrile, methanol, and in blood plasma extract at levels of 10 and 1000 ng/cm³ (n=3±SD).

Вода	50% ацетонитрил	Метанол	Экстракт плазмы крови (10 нг/см ³)	Экстракт плазмы крови (1000 нг/см ³)	Экстракт плазмы крови (10 нг/см ³) (с поправкой на внутренний стандарт)	Экстракт плазмы крови (1000 нг/см ³) (с поправкой на внутренний стандарт)
102±4%	107±7%	104±4%	91±4%	100±2%	88±1%	97±1%

стандарт, и сравнивали с концентрациями в этих же экстрактах, которые анализировались повторно не ранее чем через сутки после первого исследования. В промежутке между исследованиями матричные растворы и растворы в растворителях хранились при температуре от +4°C до +10°C. Во всех трех растворителях дериват амоксициллина стабилен в течение суток в автосамплере (табл. 3). В экстрактах плазмы крови стабильность деривата находится в диапазоне от 90.5 до 99.9%, при нормировании на внутренний стандарт от 87.6 до 96.8%, что удовлетворяет требованиям по валидации биоаналитических методик [32].

Оптимизация условий дериватизации в образцах плазмы крови. Для оптимизации условий параметров методики проводили пробоподготовку образцов плазмы крови (200 нг/см³) с варьированием таких параметров, как рН фосфатного буфера

для экстракции и дериватизации, добавляемое количество пирролидина, время дериватизации и рН экстракта перед нанесением на ТФЭ. Абсолютные извлечения внешнего и внутреннего стандартов оценивали путем сравнения образцов с добавкой стандартных образцов до пробоподготовки и с добавкой к холостым образцам после пробоподготовки дериватизированных стандартных образцов.

рН буферного раствора для экстракции и дериватизации. При изучении влияния рН фосфатного буфера на протекание реакции и на извлечение АМОХ и АМОХ-D4 готовили 5 различных буферов 100 мМ Na₂HPO₄ со значениями рН 6, 7, 8, 9, 10. рН доводили с помощью концентрированной ортофосфорной кислоты и 3М NaOH. Дальнейшая пробоподготовка образцов велась в одинаковых условиях, включая стадию дериватизации. Абсолютные извлечения внешнего и

Таблица 4. Извлечение (R, %) амоксициллина и амоксициллина-Д4 из плазмы крови при варьировании рН фосфатного буфера (n=3±SD).

Table 4. Extraction (R, %) of amoxicillin and amoxicillin-D4 from blood plasma at pH variations of the phosphate buffer (n = 3±SD).

Аналит	R, %				
	рНфосфатногобуфера				
	6	7	8	9	10
Амоксициллин	68.7±3.4	72.8±1.5	64.1±1.3	57.8±0.8	43.1±1.3
Амоксициллин-Д4	74.5±1.9	78.2±0.9	70.3±1.4	63.8±0.4	50.5±1.9

Таблица 5. Извлечение (R, %) амоксициллина и амоксициллина-Д4 из плазмы крови при разном добавляемом объеме пирролидина для дериватизации (n=3±SD).

Table 5. Extraction (R, %) of amoxicillin and amoxicillin-D4 from blood plasma with different added volumes of pyrrolidine for derivatisation (n = 3±SD).

Аналит	R, %					
	Объем пирролидина, мм ³					
	10	25	50	100	200	500
Амоксициллин	74.3±2.4	58.0±1.8	75.7±2.5	61.6±1.1	68.7±4.4	59.9±3.1
Амоксициллин-Д4	81.1±3.4	59.4±2.9	77.0±3.9	68.4±2.3	78.3±6.6	71.0±4.1

внутреннего стандартов при разных значениях рН фосфатного буфера приведены в таблице 4. Наибольшее извлечение амоксициллина и его дейтерированного аналога наблюдалось при использовании для экстракции и среды для дериватизации фосфатного буфера с рН 7. Смещение рН в область щелочной среды приводило к существенному снижению извлечения аналитов. А смещение рН в область более кислой среды (до 6) не оказывало существенного влияния на извлечение – разница не более чем на 10% (относительно точки с рН 7), что может быть связано с не полной дериватизацией, так как для раскрытия цикла в амоксициллине и проведения реакции требуется щелочная среда. Оптимальным значением рН буфера для экстракции и дериватизации амоксициллина было выбрано 7, при котором достигается наибольшее извлечение. Сильнощелочная среда без дериватирующего агента способствует деградации амоксициллина, при рН 10 извлечение аналита составляет менее 50%.

Содержание пирролидина. Для полного протекания реакции дериватизации необходимо достаточное количество пирролидина, в том числе для его расхода на

побочные реакции с компонентами матрицы. Изучение влияния количества дериватирующего агента на пробоподготовку подразумевало добавление различного количества пирролидина, а для остановки протекания реакции перед использованием полученных экстрактов для ТФЭ, рН экстрактов необходимо сместить в кислую среду до 3 путем добавления 2М соляной кислоты. Поэтому при разработке методики изучали извлечение аналитов при разном добавляемом количестве пирролидина: 10 мм³, 25 мм³, 50 мм³, 100 мм³, 200 мм³, 500 мм³ и соответственно разном добавляемом количестве 2М соляной кислоты, поскольку добавление большего количества пирролидина приводило к необходимости добавления большего количества кислоты для смещения рН раствора в кислую среду. Дальнейшая пробоподготовка образцов проводилась согласно описанной ранее схеме. В таблице 5 приведены извлечения аналитов при добавлении разного объема пирролидина для дериватизации. В каждом случае извлечение аналитов было более 55%. При многократном избытке пирролидина не происходит существенного увеличения извлечения аналитов. Реакция протекает полностью и при меньшем

Таблица 6. Извлечение (R, %) амоксициллина и амоксициллина-Д4 из плазмы крови при варьировании времени дериватизации пирролидином (n=3±SD)

Table 6. Extraction (R, %) of amoxicillin and amoxicillin-D4 from blood plasma at variation of time of derivatisation with pyrrolidine (n=3±SD).

Аналит	R, %	Время дериватизации, мин				
		5	10	20	30	60
Амоксициллин	67.0±3.8	80.9±11.1	72.3±2.7	74.0±2.2	74.5±0.7	
Амоксициллин-Д4	70.3±4.7	84.1±12.2	79.3±3.1	80.8±3.0	82.8±1.1	

Таблица 7. Извлечение (R, %) амоксициллина и амоксициллина-Д4 из плазмы крови при варьировании pH экстракта, наносимого на картридж C18 для ТФЭ (n=3±SD).

Table 7. Extraction (R, %) of amoxicillin and amoxicillin-D4 from blood plasma at pH variations of the extract applied to the C18 cartridge for SPE (n=3±SD).

Аналит	R, %	pH экстракта				
		2	3	4	5	6
Амоксициллин	81.3±3.1	82.1±5.5	72.5±3.1	71.7±1.1	65.7±0.8	71.1±7.1
Амоксициллин-Д4	81.6±1.3	79.6±4.7	72.5±2.5	73.0±1.1	68.1±0.8	72.6±7.5

избытке пирролидина. Флуктуации извлечения при изменении добавляемого объема пирролидина (от 10 до 500 мм³) вероятно могут быть связаны с деградацией самой матрицы в сильнощелочном pH и, как следствие, влиянием матричного эффекта. Оптимальным количеством пирролидина было выбрано 50 мм³.

Время дериватизации. Еще один фактор, оказывающий влияние на абсолютное извлечение при пробоподготовке и на полноту проведения дериватизации, является время проведения реакции. Рассматривали изменение времени протекания реакции от 5 до 60 минут. В каждом случае извлечение аналитов было более 65% (таблица 6). Наибольшее извлечение наблюдалось при проведении дериватизации в течение 10 минут. Увеличение времени дериватизации небольшим образом влияло как на полноту протекания реакции и как следствие на извлечение аналитов. Для эффективного процесса дериватизации подходящим количеством времени является 30 минут. При меньшем количестве времени разброс результатов оказывается большим. А увеличение времени дериватизации не оказывает значительного увеличения извлечения, но су-

щественно сказывается на общем времени пробоподготовки большой серии образцов.

pH перед нанесением на ТФЭ. Для очистки экстракта перед ВЭЖХ-МС/МС анализом в методике используются картриджи для ТФЭ с сорбентом C18 (200 мг). Для оптимизации этой стадии, чтобы не происходили потери аналита, рассматривали влияние pH экстракта, который наносится на картридж. Дериват удерживается на сорбенте C18 при нанесении в водном растворе с кислым pH. Поэтому варьировали pH в диапазоне от 2 до 7, pH доводили раствором 2М HCl и контролировали с помощью индикаторной лакмусовой бумаги. Как видно из таблицы 7, при увеличении pH происходит уменьшение извлечения аналита. Работа на критической границе устойчивости сорбента C18 (при pH 2) не является оптимальным вариантом для рутинного анализа. Поэтому в нашей методике pH экстракта, который наносится на картридж, был выбран равным 3.

Заключение

Дериватизация амоксициллина и амоксициллина-Д4 с помощью пирролидина позволяет избавиться от проблемы



нестабильности исходного анализа. Разработанная методика позволяет стабильно и воспроизводимо определять амоксициллин в плазме крови с извлечением более 80%. Аналитический диапазон определения амоксициллина в плазме крови составил от 10 до 1000 нг/см³. На рисунке 4 представлены хроматограммы бланка плазмы крови и образца с концентрацией анализа на уровне НПКО (10 нг/см³). Межсерийная прецизионность (n=9 для каждой из 6 точек градуировочной зависимости) варьировалась от 1.8 до 11.3%, правильность (n=9) – от -2.7 до 5.0%. Влияние эффекта матрицы составляло 91%. Разработанная методика была апробирована при изучении фармакокинетики амоксициллина у коров, свиней, овец и кур. В ходе экспериментальной работы было выполнено 23 аналитические серии по определению амоксициллина в

плазме крови разных видов животных с использованием контрольных образцов на 4 уровнях, входящих в аналитический диапазон: 20, 250, 400, 750 нг/см³ плазмы. Для каждого уровня концентраций выполняли анализ не менее 2 параллельных образцов контроля качества. Всего одна серия включала 8 образцов контроля качества. В ходе работы было проанализировано 184 образцов контроля качества, из которых только 2 образца имели отклонение найденной концентрации от номинальной более ±15%.

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. Komarov A.A., Engashev S.V., Engasheva E.S., Udavliev D.I., Egorov M.A., Usha B.V., Selimov R.N., Glamazdin I.G. Amoxicillin and Acidic Acid: Effective Medicines for Animal Health Protection. *Storage and processing of Farm Products*. 2021; 4; 98-117. <https://doi.org/10.36107/spfp.2021.259>

2. De Marco B.A., Natori J.S.H., Fanelli S., Tótolí E.G., Salgado H.R.N. Characteristics, Properties and Analytical Methods of Amoxicillin: A Review with Green Approach. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2017; 47: 267-277. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1281097>

3. Chen L., Wang B., Diao Z., Zhao M., Xie K., Zhang P., Wang, J. Development and Validation of an HPLC-ESI/MS/MS Method for the Determination of Amoxicillin, Its Major Metabolites, and Ampicillin Residues in Chicken Tissues. *Molecules*. 2019; 24(A): 2652. <https://doi.org/10.3390/molecules24142652>

4. De Baere S., Cherle M., Baert K., De Backer P. Quantitative Analysis of Amoxicillin and Its Major Metabolites in Animal Tissues by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2002; 74: 1393-1401. <https://doi.org/10.1021/ac010918o>

5. De Baere S., Wassink P., Croubels S., Boever S.D., Baert K., Backer P.D. Quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of amoxicillin in broiler edible tissues. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 529: 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.069>

6. Delis G., Batzias G., Kounenis G., Koutsovití-Papadopoulou M. Application and validation of a LC/fluorescence method for the determination of amoxicillin in sheep serum and tissue cage fluid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009; 49: 375-380. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.10.019>

7. Purohit T.J., Wu Z., Hanning S.M. Simple and reliable extraction and a validated high performance liquid chromatographic assay for quantification of amoxicillin from plasma. *J. Chromatogr. A*. 2020;



- 1611(A): 460611.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460611>
8. Liu C., Wang H., Jiang Y., Du Z. Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879; 533-540.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.016>
9. Lim J.W., Jung M.H., Jung S.J., Kim D.H., Park K.H., Kang S.Y. The efficacy of amoxicillin sodium against streptococcosis in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* and its pharmacokinetics. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2016; 40; 77-87.
<https://doi.org/10.1111/jvp.12321>
10. Reyns T., De Boever S., De Baere S., De Backer P., Croubels S. Tissue Depletion of Amoxicillin and Its Major Metabolites in Pigs: Influence of the Administration Route and the Simultaneous Dosage of Clavulanic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 448-454. <https://doi.org/10.1021/jf072398p>
11. Zhang C., Zeng J., Xiong W., Zeng Z. Rapid determination of amoxicillin in porcine tissues by UPLC-MS/MS with internal standard. *J. of Food Composition and Analysis.* 2020; 92(A): 103578.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103578>
12. Anfossi P., Zaghini A., Grassigli G., Menotta S., Fedrizzi G. Relative oral bioavailability of microgranulated amoxicillin in pigs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2002; 25; 329-334. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2002.00428.x>
13. Ozdemir Z., Tras B., Uney K., Eser Faki H., Besoluk T.M. Determination of milk/plasma ratio and milk and plasma pharmacokinetics of amoxicillin after intramuscular administration in lactating cows. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2019; 42: 45-51.
<https://doi.org/10.1111/jvp.12713>
14. Kandeel M. Pharmacokinetics and oral bioavailability of amoxicillin in chicken infected with caecal coccidiosis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2015; 38: 504-507.
<https://doi.org/10.1111/jvp.12205>
15. Berendsen B.J.A., Elbers I.J.W., Stolker A.A.M. Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2011; 28: 1657-1666.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2011.604045>
16. Van Holthoon F., Mulder P.P., Van Bennekom E.O., Heskamp H., Zuidema T., Van Rhijn H.J. Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; 396; 3027-3040.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3523-0>
17. Riediker S., Stadler R.H. Simultaneous Determination of Five β -Lactam Antibiotics in Bovine Milk Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2001; 73(7): 1614-1621.
<https://doi.org/10.1021/ac0011383>
18. Freitas A., Barbosa J., Ramos F. Determination of Amoxicillin Stability in Chicken Meat by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods.* 2011; 5: 471-479.
<https://doi.org/10.1007/s12161-011-9267-4>
19. Sun L., Jia L., Xie X., Xie K., Wang J., Liu J., Wang J. Quantitative analysis of amoxicillin, its major metabolites and ampicillin in eggs by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2016; 192; 313-318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.02>
20. Kaur M.P., Rao R., Nanda S. Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011; 3: 30-37.
21. Bogialli S., Capitolino V., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M., Sergi M. Simple and Rapid Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Assay for Determining Amoxicillin and Ampicillin in Bovine Tissues and Milk. *J. Agric. Food*



- Chem.* 2004; 52; 3286-3291.
<https://doi.org/10.1021/jf0499572>
22. Grujic S., Vasiljevic T., Lausevic M., Ast T. Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007; 22: 67-74.
<https://doi.org/10.1002/rcm.3333>.
23. Bruno F., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M., Samperi R. Method development for measuring trace levels of penicillins in aqueous environmental samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2001; 15: 1391-1400.
<https://doi.org/10.1002/rcm.381>
24. Abdulla A., Bahmany S.A., Wijma R., van der Nagel B.C.H., Koch B.C.P. Simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic-interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. 2017; 1060: 138-143.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.014>
25. Reyns T., Cherlet M., De Baere S., De Backer P., Croubels S. Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues. *J. Chromatogr. B*. 2008; 861(1): 108-116.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.11.007>
26. De Brito R.B., Junqueira R.G. Determination of Beta-Lactam Residues in Milk by High Performance Liquid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2006; 49: 41-46. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000200007>
27. De Baere S., De Backer P. Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta*. 2007; 586; 319-325.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.036>
28. Verdon E., Couëdor P. Multiresidue Analytical Method for the Determination of Eight Penicillin Antibiotics in Muscle Tissue by Ion-Pair Reversed-Phase HPLC after Precolumn Derivatization. *J. AOAC INTERNATIONAL*. 1999; 82: 1083-1095.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/82.5.1083>
29. Krasnyj spisok (19-e izdanie, janvar' 2022 goda). Prilozhenie k ezhegodnoj informacii o veshhestvah, chasto ispol'zuemykh pri nezakonnom izgotovlenii narkoticheskikh sredstv i psihotropnykh veshhestv (Forma D). V sootvetstvii s Konvenciej Organizacii Obedinennykh Nacij o bor'be protiv nezakonnogo oborota narkoticheskikh sredstv i psihotropnykh veshhestv 1988 goda. Podgotovlen Mezhdunarodnym komitetom po kontrolju nad narkotikami. Vienna International Centre P.O. Box 500 1400 Vienna, Austria.
30. O vnesenii izmenenij v perechen' narkoticheskikh sredstv, psihotropnykh veshhestv i ih prekursorov, podlezhashhih kontrolju v Rossijskoj Federacii: postanovlenie Pravitel'stva RF ot 03.06.2010 g. № 398. Sobranie zakonodatel'stva RF. 1998. No 27. St. 3198; 2010, No 17. St. 2100.
31. Bahmany S., Abdulla A., Ewoldt T. M.J., Oehlers P.L., de Winter B.C.M., Koch B.C.P. High-throughput analysis for the simultaneous quantification of nine beta-lactam antibiotics in human plasma by UPC2-MS/MS: Method development, validation, and clinical application. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022; 219: 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114904>
32. EMEA. Guideline in bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London. 2011.

Информация об авторах / Information about the authors

Е.Н. Гончарова – к.х.н., старший научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

Д.Э. Габидулина – научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

E.N. Goncharova – Ph.D (chemistry), senior researcher NVC Agrovetzashchita LLC, Moscow, Russian Federation, E-mail: goncharova.betty@ya.ru

D.E. Gabidullina – researcher NVC Agrovetzashchita LLC, Moscow, Russian Federation



Р.Н. Селимов – к.в.н., заведующий биоаналитической лабораторией ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

П.А. Коряковцев – научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

Ю.В. Карсакова – научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

С.В. Козлов – старший научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

А.А. Комаров – д.б.н., профессор РАН, профессор кафедры ветеринарной медицины, Московский государственный университет пищевых производств, Москва, директор центра доклинических исследований ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

Е.С. Енгашева – д.б.н., директор по науке ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

С.В. Енгашев – д.в.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

Б.В. Уша – д.в.н., профессор, академик РАН, научный руководитель института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, Московский государственный университет пищевых производств, Москва

Д.И. Удавлиев – д.б.н., профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия

И.Г. Гламаздин – д.в.н., профессор, директор института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

R.N. Selimov – Ph.D (veterinary medicine), head of the analytical laboratory NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

P.A. Koriakovtsev – researcher NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

Yu.V. Karsakova – researcher NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

S.V. Kozlov – senior researcher NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

A.A. Komarov – grand Ph.D (biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Department of Veterinary Medicine, Moscow State University of Food Production, Moscow, Director of the Center for Preclinical Research NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

E.S. Engasheva – grand Ph.D (biology), Director of Science NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

S.V. Engashev – grand Ph.D (veterinary medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, General Director NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

B.V. Usha – grand Ph.D (veterinary medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director of the Institute of Veterinary Medicine, Veterinary and Sanitary Expertise and Agro-Safety of the Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

D.I. Udavliev – grand Ph.D (biology), Professor of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise and Biological Safety of the Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

I.G. Glamazdin – grand Ph.D (veterinary medicine), Professor, Director of the Institute of Veterinary Medicine, Veterinary and Sanitary Expertise and Agro-Safety of the Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 13.11.2022; одобрена после рецензирования 16.12.2022; принята к публикации 21.12.2022.

The article was submitted 13.11.2022; approved after reviewing 16.12.2022; accepted for publication 21.12.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723; 546.7

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10889

Сорбция ионов Mo(VI) и Re(VII) на кремнеземе, модифицированном диметилгидразидами кислот Versatic

Светлана Александровна Заболотных^{1✉},

Татьяна Дмитриевна Батуева¹, Лариса Геннадьевна Чеканова¹

¹Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия, zabolotsveta@mail.ru✉

Аннотация. Представлены результаты изучения процессов сорбции ионов молибдена (VI) и рения (VII) из модельных растворов на диоксиде кремния, полученного из отвальных шламов медно-никелевого производства и модифицированного диметилгидразидами трет-карбоновых кислот Versatic фракции C₁₀₋₁₉. Исследовано влияние модификатора и условий модифицирования на сорбционные равновесия при различной кислотности среды. Показано, что обработка поверхности кремнезема диметилгидразидами приводит к увеличению его сорбционной емкости по ионам молибдена (VI) и смещению интервала pH максимального извлечения ионов рения (VII).

Рассмотрена возможность сорбционного разделения ионов Mo(VI) и Re(VII) при их совместном присутствии из растворов различной кислотности. Определены кинетические и термодинамические параметры сорбции при 296, 313 и 333 К. Для установления лимитирующей стадии процесса, полученные зависимости адсорбционной емкости от времени обрабатывали с помощью уравнений внутренней и внешнедиффузной кинетики, мультилинейной диффузионной модели Морриса и Вебера. Рассчитаны константы скорости сорбции ионов Mo(VI) и Re(VII) для уравнений псевдопервого и псевдвторого порядка. Полученные изотермы адсорбции молибдат- и перренат-ионов обработаны в координатах уравнений Ленгмюра и Фрейндлиха, определены основные параметры каждой модели. С помощью констант сорбционного равновесия Ленгмюра для различных температур рассчитаны термодинамические параметры сорбции. Отрицательные значения интегральной энтропии и энергий Гиббса свидетельствуют об экзотермическом и самопроизвольном протекании процесса извлечения и Mo(VI), и Re(VII). Для установления характера взаимодействия сорбента с адсорбатами рассчитаны дифференциальные энтальпии сорбции ионов. Их значения (менее 10 кДж/моль) указывают, что сорбция как молибдат-, так и перренат-ионов на изученном сорбенте обусловлена преимущественно физическими силами. При этом сорбция ионов молибдена (VI) имеет более высокие значения кинетических и равновесных характеристик, чем сорбция ионов рения (VII). С ростом температуры равновесие для обоих ионов смещается в сторону десорбции.

Ключевые слова: кремнеземы, диметилгидразиды, молибден, рений, сорбция.

Благодарности: авторы выражают благодарность заведующему лабораторией ИХТРЭМС КНЦ РАН, к.х.н. Касикову А.Г. за предоставленный образец кремнезема. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Работа выполнена в рамках государственного задания; номер государственной регистрации темы 122012100306-4.

Для цитирования: Заболотных С.А., Батуева Т.Д., Чеканова Л.Г. Сорбция ионов Mo(VI) и Re(VII) на кремнеземе, модифицированном диметилгидразидами кислот Versatic // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 6. С. 829-840. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10889>



Original article

Adsorption of Mo(VI) and Re(VII) ions on silica modified with Versatic acid dimethyl hydrazides

Svetlana A. Zabolotnykh¹✉, Tatyana D. Batueva¹, Larisa G. Chekanova¹

¹Institute of Technical Chemistry of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation, zabolotsveta@mail.ru✉

Abstract. The article presents the results of studying the adsorption processes of molybdenum (VI) and rhenium (VII) ions from silicon dioxide-based model solutions which had been obtained from waste sludge at copper-nickel production and modified with fraction C₁₀₋₁₉ of tertiary carboxylic Versatic acid dimethyl hydrazides. It studied the influence of the modifier and modification conditions on adsorption equilibria at different acidities of the medium. It was shown that the treatment of the silica surface with dimethyl hydrazides leads to an increase in its adsorption capacity with regard to molybdenum (VI) ions and a shift in the pH range for the maximum extraction of rhenium (VII) ions. It considered the possibility of adsorption separation of Mo(VI) and Re(VII) ions in their joint presence from solutions of different acidity. The kinetic and thermodynamic parameters of adsorption were determined at 296, 313, and 333 K. To establish the limiting stage of the process, the obtained adsorption capacity – time dependences were processed using the equations of internal and external diffusion kinetics and the Weber-Morris intraparticle diffusion model. The adsorption rate constants for Mo(VI) and Re(VII) ions were calculated for the pseudo-first and pseudo-second order equations. The obtained adsorption isotherms for molybdate and perrhenate ions were processed in the coordinates of the Langmuir and Freundlich equations and the main parameters for each model were determined. Using the Langmuir adsorption equilibrium constants for various temperatures, the thermodynamic adsorption parameters were calculated. Negative values of integral entropy and Gibbs energies indicate exothermic and spontaneous extraction of both Mo(VI) and Re(VII). To establish the nature of the sorbent interaction with adsorbates, the differential enthalpies of ion adsorption were calculated. Their values (less than 10 kJ/mol) indicate that the adsorption of both molybdate and perrhenate ions on the studied sorbent was mainly due to physical forces. What is more, the adsorption of molybdenum (VI) ions had higher values of kinetic and equilibrium characteristics than the adsorption of rhenium (VII) ions. As the temperature increased, the equilibrium for both ions shifted towards desorption.

Keywords: silicas, dimethyl hydrazides, molybdenum, rhenium, adsorption.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to A. G. Krasikov, Head of the Laboratory of the Institute of Chemistry and Technology of Rare Elements and Mineral Raw Materials of the Kola Science Centre of the Russian Academy of Sciences, for providing the silica sample. This work was carried out using the equipment of the Core Facilities Centre “Research of materials and matter” at the Perm Federal Research Centre of the Ural Branch of Russian Academy of Sciences.

The study received financing within the framework of state order; state registration number 122012100306- 4

For citation: Zabolotnykh S.A., Batueva T.D., Chekanova L.G. Adsorption of Mo(VI) and Re(VII) ions on silica modified with Versatic acid dimethyl hydrazides. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 829-840. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10889>

Введение

Молибден и рений широко применяются в различных областях промышленности в качестве компонентов жаропрочных сплавов [1-3]. Молибден имеет большое количество источников добычи: непосредственно молибденовые, а также медно-молибденовые, вольфрам-молибденовые, свинец-молибденовые и ванадиево-молибденовые руды [4]. В тоже

время, рений является рассеянным элементом, не имеет собственных минералов и добывается попутно из молибденовых и медных руд при их переработке на основные компоненты [2]. Потребность в соединениях рения приводит к необходимости его отделения от других металлов, в частности молибдена. В связи с этим поиск новых методов разделения рения и молибдена является актуальной задачей.

Выбор метода и реагентов для выделения веществ в первую очередь зависит от

их формы существования в растворах. В зависимости от кислотности среды молибден (VI) в растворах существует в виде: $\text{pH} < 1$ – оксокатионов MoO_2^{2+} , $\text{pH} 1$ – MoO_2OH^+ , $\text{pH} > 2$ – H_2MoO_4 , HMoO_4^- и MoO_4^{2-} [5]. Рений (VII) образует перренат-ионы ReO_4^- , устойчивые к гидролизу [6] и существующие в широком интервале pH. Для выделения молибдена из технологических растворов и отходов используют методы его осаждения в виде неорганических и органических соединений (гидроксид аммония, уротропин) [7]. Помимо этого, для извлечения молибдена и рения применяют экстракцию алифатическими спиртами или третичными аминами [8, 9], ионный обмен (основные иониты марки Purolite) и сорбцию [10, 11]. Среди большого количества сорбентов, предлагаемых для выделения элементов, наилучшими характеристиками обладают поверхностно-модифицированные сорбенты. Одним из распространенных неорганических сорбентов является импрегнированный различными органическими реагентами диоксид кремния [12].

Сырьем для получения модификатора является кубовый остаток от производства неоексановой кислоты, который образуется в результате протекания побочных реакций и является коммерческим продуктом с торговым названием Versatic 1019 (смесь α -разветвленных третичных карбоновых кислот общей формулы $\text{CH}_3\text{R}_1\text{R}_2\text{CC}(\text{O})\text{OH}$, где R_1 и R_2 – алкильные радикалы с суммой атомов углерода 1019) [13]. Диметилгидразиды $\text{RC}(\text{O})\text{NHN}(\text{CH}_3)_2$ кислот Versatic, полученные в лаборатории органических комплексообразующих реагентов «ИТХ УрО РАН», показали себя в качестве эффективных экстрагентов различных ионов металлов [14, 15]. Данные реагенты, закрепленные на неорганической основе, например, на мезопористом диоксиде кремния, придают получаемым сорбентам основные свойства, позволяющие извлекать комплексные анионы металлов

из кислых растворов [16]. Целью данной работы является изучение равновесных и кинетических характеристик сорбции ионов молибдена (VI) и рения (VII) на кремнеземе, синтезированного из отходов медно-никелевого и никелевого производства и модифицированного диметилгидразидами, и установление возможности их сорбционного разделения.

Экспериментальная часть

Объекты исследования Кремнезёмная основа (SiO_2) получена в соответствии с методикой, описанной [17] из шлаков медно-никелевого и никелевого производства. Модификация поверхности кремнезёмов осуществлялась методом пропитки при мольных соотношениях кремнезёмная основа : модификатор = 1:0.1 и 1:0.01 [18]. Навеску кремнезёма помещали в круглодонную колбу, добавляли рассчитанное количество $\text{N}'\text{,N}'$ -диметилгидразида (ДМГД) трет-карбоновых кислот Versatic фракции C_{10-19} , этиловый спирт и кипятили с обратным холодильником в течение 6 часов (сорбент III выдерживали без кипячения), затем образец отфильтровывали, сушили при температуре 70°C до удаления этанола.

Текстурные свойства сорбентов (таблица 1) определяли методом низкотемпературной сорбции азота на приборе ASAP 2020 (Micromeritics) после дегазации исследуемого материала в вакууме при температуре 90°C в течение 3 ч. Удельную поверхность образцов ($S_{\text{уд}}$) и общий объём пор ($V_{\text{пор}}$) определяли методом Брунауэр-Эммет-Теллера, распределение пор по размерам определяли по изотермам десорбции, используя метод Барретт-Джойнер-Халенда в интервале размеров пор 1.7-300 нм [19].

Для приготовления 0.01 моль/ дм^3 раствора MoO_4^{2-} навеску $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а., «ОНИКС») 0.2420 г растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 см^3 . Раствор ReO_4^- с концентрацией 0.01 моль/ дм^3 готовили растворе

Таблица 1. Характеристики исходного и модифицированных сорбентов
 Table 1. Characteristics of the original and modified sorbents

№	I	II	III	IV
Сорбенты и условия их модификации	SiO ₂	I + ДМГД 1019, t=80°C	I + ДМГД 1019, t=25°C	I + ДМГД 1019, t=80°C
SiO ₂ : ДМГД	–	1:0.1	1:0.01	1:0.01
S _{уд} , м ² /г	84.58	2.69	60.80	71.56
V _{пор} , см ³ /г	0.48	0.003	0.35	0.44
d _{пор} , нм	16.29	4.35	15.29	17.39
pH _{ИЭТ}	8.34	7.35	8.73	8.58
СОЕ _{Н+} , ммоль/г	1.07	0.80	1.15	1.15
pK _{a1}	6.60	4.38	5.78	5.98

нием навески ГСО NaReO₄ (Sigma Aldrich) 0.1370 г в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 см³.

Концентрированную H₂SO₄ (ρ=1.83 г/см³, х.ч., «СигмаТек») использовали для приготовления растворов меньшей концентрации. Раствор 0.1 моль/дм³ NaOH готовили из фиксанала.

Методы исследования. Для установления возможности сорбционного извлечения ионов из водных растворов предварительно изучена их индивидуальная и совместная сорбция при 296 К в интервале кислотности от 5 моль/дм³ H₂SO₄ до pH 10. В мерные колбы на 50 см³ вносили 0.100±0.005 г сорбента, рассчитанные количества растворов H₂SO₄ или NaOH, создавали концентрацию иона металла 0.001 моль/дм³, доводили до метки дистиллированной водой и выдерживали при постоянной температуре в термостатирующей бане ТЖ-ТБ-01/16 в течение 30 мин. При изучении совместной сорбции в растворе создавали одинаковую концентрацию по обоим ионам металла (0.001 моль/дм³). Отделяли осадок фильтрованием, измеряли pH фильтрата на иономере И-160М и определяли остаточное содержание металла фотометрически [20, 21]. Сорбционную емкость (E, ммоль/г) рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{n_0 - n_{\text{ост}}}{m} \cdot 1000,$$

где n₀ – введенное количество иона металла, моль; n_{ост} – остаточное содержание иона металла в фильтрате после сорбции, моль; m – масса сорбента, г.

Изучение кинетических и термодинамических параметров, а также совместной сорбции проводили на кремнеземе III (наиболее устойчивом к набуханию). Для Mo(VI) pH смесей поддерживали в интервале 2.2-2.5, для Re(VII) – 1.91-1.95.

Кинетику сорбции исследовали методом ограниченного объема раствора [22] при температурах 296, 313 и 333 К. Навески сорбента 0.100±0.005 г помещали в мерные колбы на 50 см³, вносили аликвоту раствора соли металла, рассчитанные количества 0.1 моль/дм³ раствора H₂SO₄, разбавляли до метки водой и выдерживали в течение различного времени (3, 5, 8, 10, 15 мин и т.д.).

Для определения стадии, лимитирующей скорость протекания процесса сорбции, использовали графоаналитический метод построения зависимостей –ln(1-F)=f(τ) (внешнедиффузионная кинетика) и F=f(τ^{1/2}) (внутридиффузионная кинетика). F=E/E_ε – степень завершения процесса, E и E_ε – значения адсорбции в момент времени τ и в состоянии равновесия. Также применяли мультилинейную диффузионную модель Вебера и Морриса [23, 24], которая описывается уравнением:

$$E = K_{id} \cdot \tau^{1/2} + C,$$

где E – величина адсорбции (ммоль/г) в момент времени τ, мин; K_{id} – константа скорости адсорбции внутри частицы (внутренняя диффузия); C – константа, связанная с толщиной диффузионного пограничного слоя (внешняя диффузия).

Если значение C мало или близко к нулю, то считается, что скорость сорбции лимитируется преимущественно внутренней диффузией [25].

Для описания кинетики адсорбции применяли уравнения псевдопервого (Лагергрена):

$$\ln(E_{eq} - E) = \ln E_{eq} - k_1 \cdot \tau$$

и псевдвторого порядка (Хо и Маккея) [26]:

$$\frac{\tau}{E} = \frac{1}{k_2 \cdot E_{eq}^2} + \frac{\tau}{E_{eq}}$$

где τ – время, мин; k_1 и k_2 – константы скорости реакции соответственно псевдопервого, мин^{-1} , и псевдвторого порядка, $\text{г}/(\text{ммоль} \cdot \text{мин})$; E и E_{eq} – количества адсорбированного металла в момент времени τ и после установления равновесия.

Для определения термодинамических параметров процесса строили изотермы адсорбции при температурах 296, 313 и 333 К. В мерных колбах на 50 см^3 готовили серию растворов с концентрациями молибдата или перрената натрия от 0.1 до 5 $\text{ммоль}/\text{дм}^3$, вносили 0.100 ± 0.005 г сорбента и выдерживали в течение 30 мин (для Mo) или 45 мин (для Re). Полученные изотермы обрабатывали в линейных координатах уравнений Ленгмюра:

$$\frac{1}{E} = \frac{1}{K_L \cdot E_{max}} \cdot \frac{1}{C_{eq}} + \frac{1}{E_{max}}$$

и Фрейндлиха [27]:

$$\ln E = \ln K_F + n \cdot \ln C_{eq},$$

где K_L и K_F – константы адсорбционного равновесия уравнений Ленгмюра и Фрейндлиха; C_{eq} – равновесная концентрация металла, $\text{моль}/\text{дм}^3$; E – количество адсорбированного металла для равновесной концентрации C_{eq} , $\text{моль}/\text{г}$; E_{max} – предельная адсорбция, $\text{моль}/\text{г}$; n – показатель приближения изотермы к прямой. На основании полученных значений констант адсорбции Ленгмюра строили график $\ln K_L = f(1/T)$ (T – температура, К), определяли тангенс угла наклона прямой и рассчитывали энтальпию адсорбции как $\Delta H = -R \cdot \text{tg} \alpha$ ($\text{кДж}/\text{моль}$), $R = 8.314$ $\text{Дж}/\text{моль} \cdot \text{К}$. Значения свободной энергии Гиббса

($\text{кДж}/\text{моль}$) для разных температур рассчитывали по уравнению $\Delta G = -RT \ln K_L$, значения энтропий ($\text{Дж}/\text{моль} \cdot \text{К}$) – из уравнения $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ [24].

Для установления механизма сорбции определяли дифференциальную (изостерическую) теплоту адсорбции (q_A , $\text{кДж}/\text{моль}$) [27]. На полученных изотермах проводили линии, параллельные оси абсцисс, и по точкам их пересечений с графиками находили значения соответствующих концентраций для разных температур. Строили зависимость $\ln C = f(1/T)$ и по тангенсу угла наклона прямой находили значение дифференциальной теплоты адсорбции $q_A = R \cdot |\text{tg} \alpha|$. Для молибдена выбрана изостера со значением адсорбции 0.15 $\text{ммоль}/\text{г}$, для рения – 0.02 $\text{ммоль}/\text{г}$.

Обсуждение результатов

Сорбция. Модификация диоксида кремния ДМГД приводит увеличению сорбционной емкости по ионам молибдена (VI) в интервале pH 2.0–4.0 (рис. 1а). На исходном кремнеземе (I) она составила 0.21 $\text{ммоль}/\text{г}$, а на сорбенте III – 0.34 $\text{ммоль}/\text{г}$. Увеличение количества диметилгидразида (сорбент II – 1:0.1, сорбенты III и IV – 1:0.01) не оказывает значительного влияния на характеристики сорбции.

Интервал pH наибольшей сорбции ионов Re(VII) значительно различается для разных кремнезёмов (рис. 1б). Так, на сорбенте I E_{max} составила 0.1 $\text{ммоль}/\text{г}$ ($\text{pH}_{\text{равн}} 0$), на сорбентах II и III – 0.12 и 0.073 $\text{ммоль}/\text{г}$ соответственно ($\text{pH}_{\text{равн}} 2$); IV – 0.092 $\text{ммоль}/\text{г}$ ($\text{pH}_{\text{равн}} 4.18$).

Изучение сорбции ионов молибдена (VI) и рения (VII) от pH на сорбенте III при совместном присутствии (рис. 2) показало, что максимумы их извлечения находятся при разных значениях pH: 2.0 для рения и 3.0–4.0 для молибдена. Это

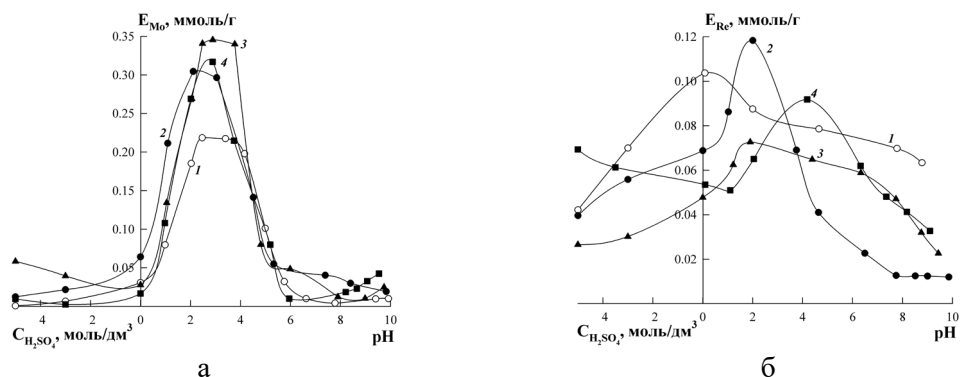


Рис. 1. Сорбционная емкость сорбентов по отношению к ионам Mo(VI) (а) и Re(VII) (б) от $pH_{равн}$ и концентрации кислоты:
 1 – сорбент I, 2 – сорбент II, 3 – сорбент III, 4 – сорбент IV.

Fig. 1. Adsorption capacity of sorbents with respect to Mo(VI) (a) and Re(VII) (b) ions depending on pH_{eq} and acid concentration:
 1 – sorbent I, 2 – sorbent II, 3 – sorbent III, 4 – sorbent IV.

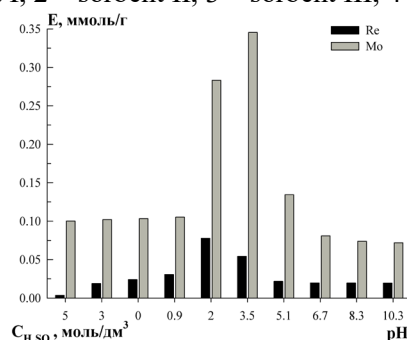


Рис. 2. Зависимость сорбционной емкости сорбента III от $pH_{равн}$ для Mo(VI) и Re(VII) при их совместном присутствии.

Fig. 2. Dependence of the adsorption capacity of sorbent III on pH_{eq} for Mo(VI) and Re(VII) in their joint presence.

говорит о возможности разделения элементов в интервале pH 3.0-4.0.

Кинетика сорбции. Построены кинетические кривые сорбции молибдена и рения на сорбенте III (рис. 3). Увеличение температуры не оказывает значительного влияния на вид кинетических кривых сорбции молибдат-ионов, лишь наблюдается небольшое увеличение емкости сорбента. Для сорбции перренат-ионов увеличение температуры приводит к уменьшению количества адсорбированного металла, что связано с преобладанием процесса десорбции. При всех температурах достаточно 30 и 45 мин для достижения максимального значения сорбции ионов Mo(VI) и Re(VII), соответственно.

Согласно значениям коэффициентов линейной корреляции для зависимостей

внешне- и внутридиффузионной кинетики (табл. 2) для молибдат-ионов при комнатной температуре лимитирующей стадией является внешняя диффузия, то есть перенос массы сорбата из объема жидкости к частицам сорбента. При повышении температуры скорость движения ионов в растворе увеличивается, и на скорость адсорбции на начальном этапе начинает оказывать значительное влияние внутренняя диффузия. На рис. 4 (график 1) представлена кинетическая зависимость сорбции молибдена при 313 К, обработанная по уравнению Вебера и Морриса. Можно выделить две стадии: 1 – значение тангенса угла наклона (K_{id}) больше значения свободного коэффициента (С), из чего можно сделать вывод, что основной лимитирующей стадией в

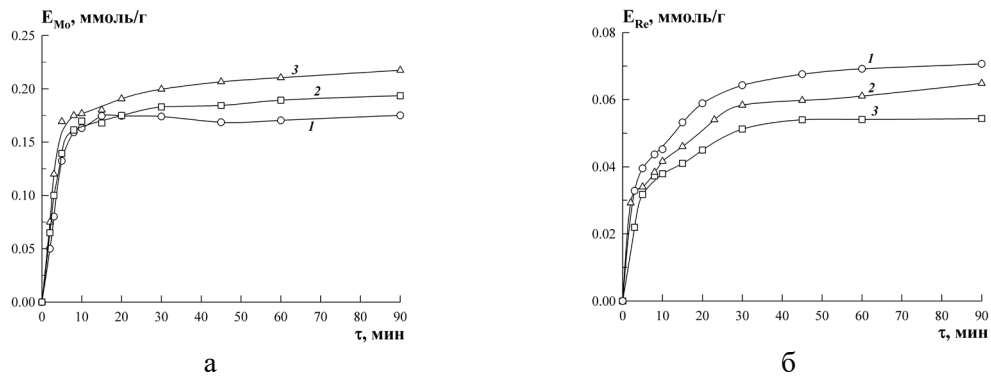


Рис. 3. Кинетические кривые адсорбции ионов MoO_4^{2-} (а) и ReO_4^- (б) на сорбенте III при различных температурах: 1 – 296 К, 2 – 313 К, 3 – 333 К.

Fig. 3. Kinetic curves of adsorption of MoO_4^{2-} (a) and ReO_4^- (b) ions on sorbent III at different temperatures: 1 – 296 K, 2 – 313 K, 3 – 333 K.

Таблица 2. Значения коэффициентов линейной корреляции зависимостей $-\ln(1-F)=f(\tau)$ и $F=f(\tau^{1/2})$
 Table 2. The values of the correlation coefficients of the linear dependences $-\ln(1-F)=f(\tau)$ and $F=f(\tau^{1/2})$

Ион	Т, К	R^2		Лимитирующая стадия
		$-\ln(1-F)=f(\tau)$	$F=f(\tau^{1/2})$	
MoO_4^{2-}	296	0.9842	0.9021	внешняя диффузия
	313	0.6355	0.7079	
	333	0.9310	0.9642	смешаннодиффузионная кинетика
ReO_4^-	296	0.9759	0.9868	смешаннодиффузионная кинетика
	313	0.9629	0.9759	
	333	0.9529	0.9291	

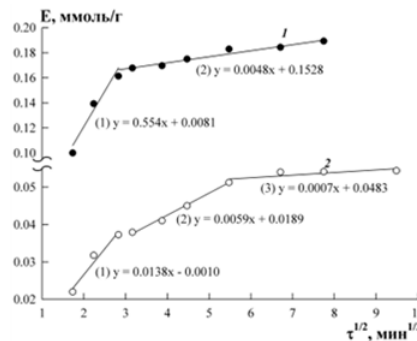


Рис. 4. Обработка кинетических кривых сорбции: 1 – MoO_4^{2-} при 313 К, 2 – ReO_4^- при 333 К, в координатах модели Вебера и Морриса.

Fig. 4. Processing of kinetic curves of adsorption: 1 – MoO_4^{2-} at 313 K, 2 – ReO_4^- at 333 K, in the coordinates of the Weber-Morris model

первые 10 мин является внутренняя диффузия; 2 – K_{id} значительно меньше, а C больше, значит на этом отрезке времени скорость адсорбции лимитируется внешней диффузией.

Полученные значения коэффициентов корреляции для различных моделей диффузии для рения достаточно высокие и близкие, что указывает на смешаннодиффузионный характер его сорбции на

выбранном сорбенте (табл. 2). По уравнению Вебера и Морриса обработана кинетическая зависимость сорбции рения при 333 К (рис. 4, график 2). Выделены три стадии: 1 – как и в случае с молибденом в первые 10 мин скорость адсорбции лимитируется в основном внутренней диффузией; 2 – переходный этап, когда влияние внешней диффузии начинает постепенно расти. На отрезке 3 основная часть актив-

Таблица 3. Кинетические параметры адсорбции ионов MoO_4^{2-} и ReO_4^- на сорбенте III при различных температурах

Table 3. Kinetic parameters of MoO_4^{2-} and ReO_4^- ion adsorption on sorbent III at different temperatures

Ион	Т, К	Кинетика псевдопервого порядка		Кинетика псевдвторого порядка	
		R^2	$k_1, \text{мин}^{-1}$	R^2	$k_2, \text{г}/(\text{ммоль}\cdot\text{мин})$
MoO_4^{2-}	296	0.3748	0.0232	0.9976	7.14
	313	0.8360	0.0237	0.9996	2.28
	333	0.9426	0.0179	0.9901	1.63
ReO_4^-	296	0.9940	0.0576	0.9992	2.55
	313	0.8832	0.0415	0.9975	2.82
	333	0.9688	0.0889	0.9989	3.62

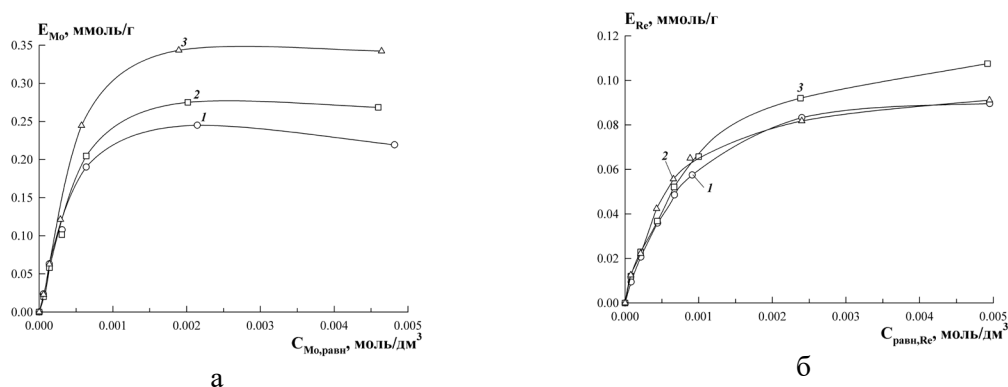


Рис. 5. Изотермы адсорбции ионов MoO_4^{2-} (а) и ReO_4^- (б) на сорбенте III при различных температурах: 1 – 296 К, 2 – 313 К, 3 – 333 К.

Fig. 5. Isotherms of adsorption of MoO_4^{2-} (a) and ReO_4^- (b) ions on sorbent III at different temperatures: 1 – 296 K, 2 – 313 K, 3 – 333 K.

ных центров сорбента заполнена, миграция сорбата в пределах пор сорбента практически отсутствует, и рост значения адсорбции связан с постепенным переносом ионов рения из объема раствора к поверхности сорбента.

Согласно данным таблицы 3 полученные кинетические кривые сорбции MoO_4^{2-} и ReO_4^- хорошо описываются уравнениями псевдвторого порядка. При этом константа скорости адсорбции молибдена снижается с ростом температуры, что указывает на преимущественно физический характер адсорбции. Для рения константа скорости незначительно увеличивается с ростом температуры.

Термодинамика сорбции. Построены изотермы адсорбции ионов Mo(VI) и Re(VII) на сорбенте III (рис. 5) при различных температурах. В таблице 4 представлены рассчитанные значения коэф-

фициентов для наиболее часто применяемых моделей описания сорбционных изотерм. Коэффициенты корреляции для модели Ленгмюра имеют более высокие значения, то есть для данного интервала концентраций ионов металлов можно говорить о мономолекулярной адсорбции. Так же на изотермах наблюдаются пологие участки, что указывает на предел заполнения поверхности сорбента. При увеличении температуры равновесные константы сорбции, особенно для ионов молибдена (VI), уменьшаются, то есть равновесие смещается в сторону десорбции. Помимо этого, с изменением температуры от 296 до 333 К увеличивается значение теоретической предельной емкости сорбента (E_{max}).

Для расчета термодинамических параметров сорбции использовали константы адсорбционного равновесия модели Ленгмюра (табл. 5). Процесс для обоих

Таблица 4. Константы уравнений Ленгмюра и Фрейндлиха для изотерм адсорбции ионов MoO_4^{2-} и ReO_4^- на сорбенте III

Table 4. The constants of the Langmuir and Freundlich equations for the adsorption isotherms of MoO_4^{2-} and ReO_4^- ions on sorbent III

Модель	Параметр	MoO_4^{2-}			ReO_4^-		
	T, K	296	313	333	296	313	333
Ленгмюра	R^2	0.9883	0.9823	0.9882	0.9982	0.9805	0.9885
	K_L	1081.6	345.6	209.8	1043.4	983.2	880.6
	E_{max} , ммоль/г	0.43	1.01	1.91	0.12	0.13	0.14
Фрейндлиха	R^2	0.8429	0.8726	0.8734	0.9374	0.8943	0.9608
	K_F	0.005	0.01	0.015	0.0023	0.0017	0.0026
	n	0.497	0.593	0.620	0.559	0.496	0.560

Таблица 5. Термодинамические параметры адсорбции ионов MoO_4^{2-} и ReO_4^-

Table 5. Thermodynamic parameters of MoO_4^{2-} and ReO_4^- ion adsorption.

Ион	T, K	ΔG , кДж/моль	ΔH , кДж/моль	ΔS , Дж/моль·K	q_A , кДж/моль
MoO_4^{2-}	296	-17.13	-35.30	-61.51	7.45
	313	-15.21		-64.11	
	333	-14.80		-61.50	
ReO_4^-	296	-17.12	-3.77	45.06	2.81
	313	-17.89		45.26	
	333	-18.78		45.06	

металлов является экзотермическим, при этом абсолютное значение энтальпии для MoO_4^{2-} выше, чем для ReO_4^- , то есть температура влияет на сорбционное равновесие ионов молибдена (VI) сильнее. Отрицательные значения изменения энтропии для молибдена свидетельствуют о снижении беспорядка в системе, что характерно для сорбции, так как происходит связывание подвижных анионов на поверхности неподвижного сорбента. Положительные значения энтропии сорбции рения подтверждают существенное влияние десорбции на извлечение.

Полученные значения дифференциальной теплоты адсорбции q_A для обоих ионов менее 10 кДж/моль, из чего можно сделать вывод о преимущественно физическом характере сорбции [28].

Заключение

Из результатов проведенных исследований установлено, что интервал рН максимальной сорбции для ионов Mo(VI) на всех сорбентах шире, чем для ионов Re(VII). Емкость рассмотренных сорбентов по молибдену (0.35 ммоль/г) и его

константа скорости адсорбции при комнатной температуре (7.14 г/(ммоль·мин)) значительно выше по сравнению с параметрами рения (0.12 ммоль/г и 2.6 г/(ммоль·мин), соответственно). Абсолютные значения интегральной и дифференциальной теплот адсорбции ионов Mo(VI) выше, что указывает на преимущество сорбции ионов молибдена, чем ионов рения. Различие в знаках величин энтропии означает, что в процессе извлечения молибдат-ионов преобладает сорбция, а на извлечение перренат-ионов значительно влияет десорбция. При этом параметры сорбции Re(VII) менее зависят от температуры. Согласно полученным результатам, возможно сорбционное разделение ионов молибдена (VI) и рения (VII) в интервале значений рН 2.5-3.0.

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

1. Денисова Э.И. Прикладное материаловедение. Металлы и сплавы. Екатеринбург: УрФУ, 2018. 216 с.
2. Мальцева Е.Е., Блохин А.А., Мурашкин Ю.В., Михайленко М.А. Влияние кислотности растворов на сорбцию рения и молибдена на некоторых слабоосновных анионитах // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2012. Т. 12, № 1. С. 78-84.
3. Ергожин Е.Е., Чалов Т.К., Ковригина Т.В., Мельников Е.А. Сорбция ионов молибдена (VI) новыми синтетическими сорбентами // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2018. Т. 18, № 3. С. 309-315.
4. Ватолин Н.А., Халезов Б.Д., Харин Е.И., Зеленин Е.А. Краткий обзор способов переработки молибденовых концентратов и поиск экологически чистой технологии // *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал)*. 2011. № 12. С. 170-175.
5. Кочелаева Г.А., Иванов В.М., Гусейнова А.Р. Комплексообразование в системе молибден (VI) – 3,5-ди-Вг-ПААФ – гидроксилламин в растворе и на сорбенте // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2002. Т. 43, № 3. С. 155-162.
6. Шарафутдинов У.З., Курбанов М.А., Аликулов Ш.Ш., Ганиева Д.С. Исследование сорбционных свойств анионитов при совместной сорбции урана и рения в процессе подземного выщелачивания урана // *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал)*. 2021. № 3-1. С. 136-146.
7. Колобов Г.А., Воденников С.А., Павлов В.В., Воденникова О.С., Печерица А.К. Извлечение молибдена из отработанных растворов и расплавов травления молибденосодержащих продуктов // *Металлургия*. 2018. Т. 39, № 1. С. 68-73.
8. Дворникова А.М., Касиков А.Г. Изучение возможности селективной экстракции рения смесью алифатических спирта и кетона из кислых растворов переработки ренийсодержащих // *Труды Кольского научного центра РАН*. 2021. Т. 12, № 2 (5). С. 83-86.
9. Петрова А.М., Касиков А.Г. Извлечение рения и молибдена экстракцией синергетическими смесями на основе третичных аминов и алифатических кетонов из азотнокислых растворов // *Труды Кольского научного центра РАН*. 2015. Т. 31, № 5. С. 190-194.
10. Умарахунов М.Х., Садыкова У.А., Ходжаева Г.А. Сорбция молибдена (VI) из растворов минеральных солей // *Журнал физической химии*. 2011. Т. 85. № 2. С. 391-393.
11. Kasikov A.G., Shchelokova E.A., Dvornikova A.M. Recovery of rhenium from sulfuric acid solution by TOPO-impregnated silica sorbents // *Separation Science and Technology*. 2021. Vol. 56. Is. 2. P. 242-251.
12. Трошкина И.Д., Веселова О.А., Вацура Ф.Я., Захарьян С.В., Серикбай А.У. Сорбция рения из сернокислых растворов импрегнатами, содержащими триалкиламин // *Известия высших учебных заведений. Цветная металлургия*. 2017. № 5. С. 42-49.
13. Паспорт продукта: Versatic 1019 Acid. Material Safety Data Sheet. Re-issued by Momentive Specialty Chemicals B. V. Revision date 29.06.2011.
14. Radushev A.V., Batueva T.D., Kataev A.V. Versatic Functional Tert-Carboxylic Acids as Metal Extractive Agents // *Separation science and technology*. Vol. 50, no. 4, pp. 512-519.
15. Батуева Т.Д., Щербань М.Г. Экстракция рения (VII) гидразидами и N',N'-диалкилгидразидами кислот Versatic // *Журнал неорганической химии*. 2017. Т. 62, № 10. С. 1413-1418.
16. Batueva T., Kondrashova N., Chekanova L.G., Scherban M. Sorption of rhenium (VII) and molybdenum (VI) by modified mesoporous silicas // *Separation Science and Technology*. 2022. Vol. 57, Is. 4. P. 532-541.
17. Тимощик О.А., Щелокова Е.А., Касиков А.Г. Влияние условий получения аморфного кремнезема золь-гель методом на его свойства // *Труды Кольского научного центра РАН*. 2019. № 3. С. 368-375.
18. Batueva T.D., Kondrashova N.B., Scherban M.G. Sorbents based on mesoporous silicas modified with hydrazide functional groups // *Bulletin of the Karaganda University. Chemistry series*. 2019. Vol. 95, no. 3. P. 52-60.
19. Батуева Т.Д., Заболотных С.А., Чеканова Л.Г. Физико-химические свойства кремнеземов, модифицированных гидразидными функциональными группами // *Журнал прикладной химии*. 2022. Т. 95. Вып. 7. С. 910-918.
20. Методика количественного химического анализа № 119–X. Определение молибдена в минеральном сырье фотометрическим



методом в виде роданидного комплекса. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293756/4293756712.pdf> (дата обращения 25.05.2022)

21. ГОСТ 25278.16-87. Сплавы и лигатуры редких металлов. Методы определения рения. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294829/4294829157.pdf> (дата обращения 25.05.2022)

22. Полянский Н.Г., Горбунов Г.В., Полянская Н.Л. Методы исследования ионитов. М.: Химия, 1976. 208 с.

23. Карпов С.И. Дисс. докт. хим. наук. Воронеж, 2020, 388 с.

24. Фам Т.М., Лебедева О.Е. Изучение кинетики и термодинамики адсорбции бриллиантового зеленого на магнитном композите // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки*. 2017. Т. 274, № 25. С. 5-11.

25. Вей Мое Аунг. Дисс. канд. техн. наук. М. 2020. 144 с.

26. Piatek J., Bruin-Dickason C.N., Jaworski A., Chen J., Slabon A. Glycine-functionalized silica as sorbent for cobalt(II) and nickel(II) recovery // *Applied Surface Science*. 2020. Vol. 530, 147299.

27. Михеева Е.В. Адсорбция на однородной твердой поверхности. Уравнение Ленгмюра. Томск, ТПУ, 2011. 36 с.

28. Макаревич Н.А. Теоретические основы адсорбции. Архангельск, САФУ, 2015. 362 с.

References

1. Denisova E.I. Applied Materials Science. Metals and alloys. Ekaterinburg, UrFU Publ., 2018, 216 p.

2. Maltseva E.E., Blokhin A.A., Murashkin Y.V., Mikhailenko M.A. Effect of solution acidity on the sorption of rhenium and molybdenum on certain low-base anion exchangers. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2012; 12(1): 78-84. (In Russ.)

3. Ergozhin E.E., Chalov T.K., Kovrigina T.V., Melnikov E.A., Sorption of molybdenum ions (VI) by new synthetic sorbents. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2018; 18(3): 309-315. (In Russ.)

4. Vatolin N.A., Khalezov B.D., Kharin E.I., Zelenin E.A. A brief review of molybdenum concentrate processing methods and the search for an environmentally friendly technology, *Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2011; 12: 170-175.

5. Kochelaeva G.A., Ivanov V.M., Guseinova A.R., Complexation in the molybdenum (VI) – 3,5-di-Br-PAAF – hydroxylamine system in solution and on a sorbent. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2002; 43(3): 155-162.

6. Sharafutdinov U.Z., Kurbanov M.A., Alikulov Sh.Sh., Ganieva D.S., Adsorption properties of anion-exchange resins in joint uranium and rhenium sorption during in-situ uranium leaching. *Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2021; 3-4: 136-146. https://doi.org/10.25018/0236_1493_2021_31_0_136

7. Kolobov G.A., Vodennikov S.A., Pavlov V.V., Vodennikova O.S., Pecheritsa A.K. Extraction of molybdenum from exhaust solutions and fusions of etch of molybdenum-containing products. *Metallurgiya*. 2018; 39(1): 68-73. (In Russ.)

8. Dvornikova A.M., Kasikov A.G. The study of the selective rhenium solvent extraction possibility with the mixture of aliphatic alcohol and ketone from acid solutions of rhenium-containing wastes processing. *Trudy Kolskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2021; 12(2 (5)): 83-86. <https://doi.org/10.37614/2307-5252.2021.2.5.016>

9. Petrova A.M., Kasikov A.G. Recovery of rhenium (VII) and molybdenum (VI) by solvent extraction with synergistic mixture of tertiary amines and aliphatic ketones from nitric acid solutions. *Trudy Kolskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2021; 31(5): 190-194. (In Russ.)

10. Umarakhunov M.Kh., Sadykova U.A., Khodzhaeva G.A., Sorption of molybdenum(VI) from mineral salt solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2011; 85(2): 334-335. <https://doi.org/10.1134/S003602441102035X> (In Russ.)

11. Kasikov A.G., Shchelokova E.A., Dvornikova A.M., Recovery of rhenium from sulfuric acid solution by TOPO-impregnated silica sorbents. *Separation Science and Technology*. 2021; 56(2): 242-251. <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1718709>

12. Troshkina I.D., Veselova O.A., Vatsura F.Ya., Zakharyan S.V., Serikbay A.U. Sorption of rhenium from sulfuric acid solutions by impregnates containing trialkylamines. *Izv. vuzov. Tsvet. Metallurgiya*. 2017; 5: 42-49. <https://doi.org/10.17073/0021-3438-2017-5-42-49>



13. Versatic 1019 Acid. Material Safety Data Sheet. Re-issued by Momentive Specialty Chemicals B. V. Revision date 29.06.2011.
14. Radushev A.V., Batueva T.D., Kataev A.V. Versatic Functional tert-carboxylic acids as metal extractive agents. *Separation science and technology*. 2015; 50(4): 512-519. <https://doi.org/10.1080/01496395.2014.968258>
15. Batueva T.D., Shcherban' M.G. Rhenium (VII) extraction with Versatic hydrazides and N',N'-dialkylhydrazides. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 2017; 62(10): 1409-1413. <https://doi.org/10.1134/S0036023617100035>
16. Batueva T.D., Kondrashova N.B., Chekanova L.G., Scherban M.G., Sorption of rhenium (VII) and molybdenum (VI) by modified mesoporous silicas. *Separation Science and Technology*. 2022; 57(4): 532-541. <https://doi.org/10.1080/01496395.2021.1921801>
17. Timoshchik O.A., Shchelokova E.A., Kasikov A.G., Influence of conditions for obtaining amorphous silica by sol-gel method on its properties. *Trudy Kolskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2019; 3: 368-375. <https://doi.org/10.25702/KSC.2307-5252.2019.10.1.368-375>
18. Batueva T.D., Kondrashova N.B., Scherban M.G., Sorbents based on mesoporous silicas modified with hydrazide functional groups. *Bulletin of the Karaganda University. Chemistry series*. 2019; 95(3): 52-60. <https://doi.org/10.31489/2019Ch3/52-61>
19. Batueva T.D., Zabolotnykh S.A., Chekanova L.G., Physical and chemical properties of silicas modified with hydrazide functional groups. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2022; 95(7): 910-918. <https://doi.org/10.31857/S0044461822070106>
20. Methods of quantitative chemical analysis No. 119-X. Determination of molybdenum in minerals by photometric method in the form of rhodanide complex. Available at: <https://files.stroy-inf.ru/Data2/1/4293756/4293756712.pdf> (accessed 25.05.2022)
21. State standard 25278.16-87. Alloys and ligatures of rare metals. Methods of rhenium determination. Available at: <https://files.stroy-inf.ru/Data2/1/4294829/4294829157.pdf> (accessed 25.05.2022)
22. Polyansky N.G., Gorbunov G.V., Polyanskaya N.L. Methods of Ionites Research. M. Khimiya Publ. 1976. 208 p.
23. Karpov S.I. Diss. doct. chem. nauk. Voronezh, 2020, 388 p.
24. Pham T.M., Lebedeva O.E., Studying the kinetics and thermodynamics of diamond green adsorption on a magnetic composite. *Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Yestestvennyye nauki*. 2017; 274(25): 5-11. (In Russ.)
25. Wei Moe Aung. Diss. cand. tech. nauk. M. 2020. 144 p.
26. Piatek J., Bruin-Dickason C.N., Jaworski A., Chen J., Slabon A. Glycine-functionalized silica as sorbent for cobalt(II) and nickel(II) recovery. *Applied Surface Science*. 2020; 530: 147299. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147299>
27. Mikheeva E.V. Adsorption on a homogeneous solid surface. Langmuir equation. Tomsk, TPU Publ., 2011, 36 p.
28. Makarevich N.A. Theoretical bases of adsorption. Arkhangelsk, NArFU Publ., 2015, 362 p.

Информация об авторах / Information about the authors

С.А. Заболотных – научный сотрудник лаборатории органических комплексообразующих реагентов, к.х.н., «ИТХ УрО РАН», Пермь, Россия

Т.А. Батуева – старший научный сотрудник лаборатории органических комплексообразующих реагентов, к.х.н., «ИТХ УрО РАН», Пермь, Россия

Л.Г. Чеканова – доцент, заведующий лабораторией органических комплексообразующих реагентов, к.х.н., «ИТХ УрО РАН», Пермь, Россия

S.A. Zabolotnykh – Ph.D. (chemistry), researcher, Laboratory of Organic Complexing Reagents, "Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of RAS", Perm, Russian Federation, e-mail: zabolotsveta@mail.ru

T.D. Batueva – Ph.D. (chemistry), senior researcher, Laboratory of Organic Complexing Reagents, "Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of RAS", Perm, Russian Federation

L.G. Chekanova – Ph.D. (chemistry), associate professor, head of the Laboratory of Organic Complexing Reagents, "Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of RAS", Perm, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 14.06.2022; одобрена после рецензирования 11.12.2022; принята к публикации 18.12.2022.

The article was submitted 14.06.2022; approved after reviewing 11.12.2022; accepted for publication 18.12.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 57.088.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10890

Анализ аминокислотного состава и структуры изолятов белка амаранта при различных условиях его выделения

**Ольга Леонидовна Мещерякова¹,
Людмила Ивановна Василенко¹, Александр Сергеевич Губин¹,
Татьяна Васильевна Свиридова¹, Ольга Сергеевна Корнеева¹✉**

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия, korneeva-olgas@yandex.ru✉

Аннотация. Работа посвящена исследованию белков амаранта (*Amaranthus hypochondriacus* L.) как перспективной культуры для получения полноценного растительного белка. Определены условия максимального выхода белка из муки семян амаранта при щелочной экстракции и осаждении при различных значениях pH. Установлены молекулярные массы, аминокислотный состав и функциональные группы изолятов белка. Содержание альбуминов, глобулинов, проламинов и глютелинов в белке составило 3.5; 3.7; 0.8 и 5.7 г на 100 г муки семян амаранта соответственно. Показано, что последовательная экстракция белка водой и 0.1 М раствором NaCl при pH экстракции 12.0 с дальнейшим его осаждением из экстракта при pH 4.0 позволяет достичь максимального выхода белка из обезжиренной муки амаранта и получить белковый изолят с массовой долей белка 90 %. Выход белка составил 53.77% и 20.52% при водной и солевой экстракции соответственно. В полученных изолятах установлено наличие белков с молекулярными массами менее 15.4 кДа, 18-20 кДа, 20-36 кДа и 36-38 кДа, 41-45 кДа и 54 кДа, характерных для альбуминов, глобулинов (7S- и 11S-глобулины) и глютелинов. Содержание проламинов в изоляте белка исключалось за счет их гидрофобности. Методом капиллярного электрофореза определено, что основными аминокислотами белка семян амаранта являются аргинин, лизин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, пролин, лейцин. В изолятах белка амаранта наблюдалось снижение количества метионина и цистеина на 95 и 86% соответственно на 100 г продукта и увеличение количества остальных аминокислот. С использованием ИК-Фурье-спектроскопии установлено, что в изолятах белка существенно выражены колебания метильных и метиленовых групп, что сопровождается уменьшением растворимости полученных образцов. Эти данные не снижают биологической ценности белка и служат основанием для дальнейшего исследования функционально-технологических свойств растительного белка с целью его практического применения.

Ключевые слова: амарант, изолят белка, капиллярный электрофорез, электрофорез в ПААГ, ИК-Фурье-спектроскопия.

Благодарности: исследования проводились при финансовой поддержке РНФ в рамках выполнения Проекта № 22-26-00277

Для цитирования: Мещерякова О.Л., Василенко Л.И., Губин А.С., Свиридова Т.В., Корнеева О.С. Анализ аминокислотного состава и структуры изолятов белка амаранта при различных условиях его выделения // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 6. С. 841-848. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10890>

Original article

Analysis of an amino acid composition and the structure of amaranth protein isolates under different conditions of protein isolation

**Olga L. Meshcheryakova¹, Lyudmila I. Vasilenko¹, Alexander S. Gubin¹,
Tatyana V. Sviridova¹, Olga S. Korneeva¹✉**

²Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, korneeva-olgas@yandex.ru✉

Abstract. This work is devoted to the study of amaranth proteins (*Amaranthus hypochondriacus* L.) as a promising crop for obtaining a comprehensive plant protein. It determines the conditions for the maximum protein yield from amaranth seed flour during alkaline extraction and precipitation at different pH values. The study involved determining molecular masses, amino acid composition, and functional groups of protein isolates. The albumin, globulin, prolamin, and glutelin content in the protein were 3.5, 3.7, 0.8, and 5.7 g per 100 g of amaranth seed flour, respectively. It was shown that sequential extraction of protein with water and 0.1 M NaCl solution at the extraction pH of 12.0 with its further precipitation from the extract at the pH of 4.0 allows achieving the maximum protein yield from defatted amaranth flour and obtaining a protein isolate with a protein mass fraction of 90%. The protein yields were 53.77% and 20.52% for water and salt extraction, respectively. It was established that obtained isolates had proteins with molecular masses of less than 15.4 kDa, 18-20 kDa, 20-36 kDa, and 36-38 kDa, 41-45 kDa, and 54 kDa, which are characteristic of albumins, globulins (7S- and 11S-globulin) and glutelins. The content of prolamins in the protein isolate was excluded due to their hydrophobicity. The method of capillary electrophoresis determined that the main amino acids of the amaranth seed protein were arginine, lysine, aspartic acid, glutamic acid, proline, and leucine. Amaranth protein isolates had reduced amounts of methionine and cysteine by 95 and 86%, respectively, per 100 g of product and increased amounts of the remaining amino acids. Fourier IR spectroscopy was used to find out that protein isolates had expressed fluctuations of methyl and methylene groups, which was accompanied by a decrease in the solubility of the obtained samples. These data do not reduce the biological value of the protein and can be used for the further study of the functional and technological properties of the plant protein for its practical application.

Keywords: amaranth, protein isolate, capillary electrophoresis, PAGE, Fourier IR spectroscopy.

Acknowledgments: the study was supported by the Russian Foundation for Research, project No. 22-26-00277

For citation: Meshcheryakova O.L., Vasilenko L.I., Gubin A.S., Sviridova T.V., Korneeva O.S. Analysis of an amino acid composition and the structure of amaranth protein isolates under different conditions of protein isolation. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 841-848. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10890>

Введение

В современном мире постоянно растет потребность в белках и продуктах на их основе. Учитывая особую роль белка в питании человека, наличие его дефицита и высокие цены на белки животного происхождения, особую значимость приобретают вопросы обеспечения населения дешевыми, более доступными растительными белками [1]. Кроме того, растительное сырье для производства белков требует меньших затрат для хранения и транспортировки [2]. В настоящее время объем мирового рынка растительных белков ежегодно растет в среднем на 10.1% в год, в связи с чем поиск новых альтернативных источников белка и разработка эффективных технологий их получения является актуальной задачей. Качество пищевого белка характеризуется, прежде всего, его биологической ценностью, аминокислотным составом, коэффициентом переваримости. Большинство растительных белков лимитированы по одной или нескольким незаменимым аминокислотам. Белки злаковых культур

лимитированы по лизину и треонину, бобовых культур – по метионину и цистеину [3-5].

В качестве альтернативного источника высококачественного белка может выступать растение амарант (*Amaranthus*). Растущий в настоящее время научно-практический интерес к амаранту обусловлен тем, что амарант – источник сбалансированного по количеству незаменимых аминокислот, таких как лизин и серосодержащие аминокислоты, которые, не содержащиеся в традиционных злаковых и бобовых культурах [6]. Зерно амаранта обладает прекрасным химическим составом с высокой концентрацией белка (13-19%), что выше, чем в зерновых [7-8].

Современные технологии получения белковых продуктов из растительного сырья базируются на глубоком фракционировании макронутриентов сырья с максимальным выходом белков, их очистке, концентрировании и, при необходимости, модификации функциональных и мезо-биологических характеристик. При обогащении пищевых продуктов белком



в промышленных масштабах в большинстве случаев применяют изоляты белка. Щелочная экстракция с последующим осаждением белков в изоэлектрической точке является традиционным и наиболее часто используемым методом для извлечения белков из семян амаранта. В результате белки могут быть подвержены существенным структурным изменениям, что влияет на функциональные свойства (эмульгирование, вспенивание, гелеобразование, растворимость) экстрагированных белков [9-10], а также возможно изменение аминокислотного состава полученных изолятов. В связи с этим изучение условий экстрагирования и осаждения белков имеет большое значение для снижения нежелательных последствий.

Целью работы является определение оптимальных условий экстракции и осаждения белков амаранта, обеспечивающих их максимальный выход, определение фракционного состава и молекулярной массы белков, аминокислотного состава полученных изолятов белка и изучение структурных изменений белка в процессе экстракции и осаждения.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали обезжиренную муку семян амаранта с последующим рассевом через сито № 1. Определение фракционного состава белка осуществляли последовательно экстракцией водой, раствором 0.1М NaCl, раствором 0.1М NaOH и раствором 70% этилового спирта. Все фракции собирались отдельно. Разделение белков по молекулярной массе осуществляли методом ультрафильтрации на плоских мембранных элементах марок УПМ-10, УПМ-20, УПМ-100. Осаждение белков осуществляли в изоэлектрической точке 1М раствором HCl. Массовую долю белка в полученных фракциях определяли методом Кьельдаля по ГОСТ 10846-74.

Изучение влияния pH на выход белка и молекулярную массу полученных фракций белка амаранта проводили в диапазоне pH 7.5-12.0. Для этого муку амаранта суспендировали в воде при гидромодуле 1:8 (масс/объем), отбирали надосадочную жидкость, затем к осадку добавляли 0.1М раствор NaCl при том же гидромодуле и отбирали надосадочную жидкость. Значение pH при экстракции белков корректировали добавлением 0.5М раствора NaOH. Для определения оптимального значения pH осаждения белков экстрагированные надосадочные жидкости доводили до pH 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 и 6.0 с использованием 1М раствора HCl.

Молекулярную массу полученных фракций определяли путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), используя следующие реактивы: 30%-ный раствор акриламида; 10%-ный раствор DS-NA; 2 М ТРИС-HCl (pH 8.8); 1 М ТРИС-HCl (pH 6.8); 1%-ный раствор персульфата аммония; 0.5%-ный раствор бромфенолового синего; 2М раствор соляной кислоты; глицин; 2-меркаптоэтанол; кумасси R-250; кумасси G-250; этиловый спирт; ледяная уксусная кислота.

Определение аминокислотного состава отдельных фракций белка амаранта и полученных изолятов осуществляли по ГОСТ 32195-2013 (ISO 13903:2005). В работе использовали бидистиллированную воду, этанол «ч.д.а», триэтиламин (AcrosOrganics, США), трифторуксусную кислоту (Sigma, США), фенилизотиоцианат (AcrosOrganics, США), а также набор аминокислот (ICN, США) и стандартную смесь 18 аминокислот. Определение аминокислот проводили в системе капиллярного электрофореза «Капель105» (Льюмэкс, Россия) с программой обработки данных «Мультихром» (Амперсенд, Россия). Рабочая длина волны детектора 270 нм или 195 нм для более чувствительного детектирования. Эффективная длина капилляра 35 см до детектора, напряженность электрического поля 580В/см. Анализируемую смесь вводили

избыточным давлением 20 мБарр в течение 10 с. Буферный раствор, содержащий 25 мМ додецилсульфата натрия, 1.8 мМ тетрабората натрия и 10.7 мМ дигидрофосфата натрия, использовали для всех электрофоретических разделений [11].

Структуру белковых изолятов изучали с использованием ИК-Фурье-спектрометрии. Для этого сравнивали ИК-Фурье спектры изолятов при водной и солевой экстракции со спектрами тех же образцов, но в присутствии 0.1 М HCl. Инфракрасные спектры поглощения определяли в диапазоне 400-4000 см⁻¹ на ИК-Фурье-спектрометре Bruker VERTEX 70 в режиме отражения.

Обсуждение результатов

В результате последовательной экстракции различными экстрагентами общая масса полученных белков из муки семян амаранта составила 13.7%. Содержание альбуминов, глобулинов, проламинов и глютелинов составило 3.5; 3.7; 0.8 и 5.7 г на 100 г муки семян амаранта соответственно. При этом преобладающей фракцией белка была глютелиновая фракция, количество проламинов оказалось самым низким, их содержание примерно в 7 раз было ниже по сравнению с глютелинами, что свидетельствует о незначительном количестве гидрофобных белков в зерне амаранта.

Величина pH при экстракции существенно влияет на выход белка. В связи с

этим экстракцию отдельных фракций белков амаранта проводили при значениях pH от 7.5 до 12.0, используя в качестве экстрагентов воду и 0.1 М раствор NaCl (табл. 1).

Как видно из табл. 1, количество экстрагируемых белков увеличивалось с увеличением значения pH. Максимальное количество экстрагируемого белка наблюдалось при pH 12.0 как при использовании воды, так и при использовании 0.1 М NaCl в качестве экстрагента (53.7 и 20.5% соответственно). Однако в случае использования раствора воды в качестве экстрагента выход белка увеличивался в 2.6 раза.

Далее исследовали влияние pH 2.0-6.0 на выход белков при их осаждении из полученных экстрактов. Максимальный выход белков как из водного, так и из солевого экстрактов (53.77 и 20.52% соответственно) наблюдался при pH 4.0 (табл. 2). Это свидетельствует о том, что изоэлектрическая точка белков амаранта находится при pH 4.0. Вода является наиболее эффективным экстрагентом для солубилизации белка из амарантовой муки, однако для извлечения солерастворимых фракций белков необходимо проводить дополнительную экстракцию 0.1 М раствором NaCl.

С использованием электрофореза в ПААГ установлены молекулярные массы фракций белков, полученных при водной

Таблица 1. Влияние pH раствора экстрагента на содержание белка, % от общего количества белка

Table 1. Effect of the pH of the extraction solution on the protein content, % of total protein amount

Экстрагент	Количество белка, %, при значениях pH									
	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5	11.0	11.5	12.0
Вода	18.6	22.7	40.6	41.1	42.5	43.1	45.4	47.5	49.6	53.7
0.1 М NaCl	8.5	10.2	13.4	15.2	14.7	13.5	13.0	12.7	16.5	20.5

Таблица 2. Влияние pH на выход белка при его осаждении из экстрактов

Table 2. Effect of the pH on the protein yield when precipitated from extracts

Экстрагент	Количество белка, %, при значениях pH				
	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
Вода	40.53	49.62	53.77	50.61	43.32
0.1 М NaCl	18.66	18.66	20.52	15.02	8.31

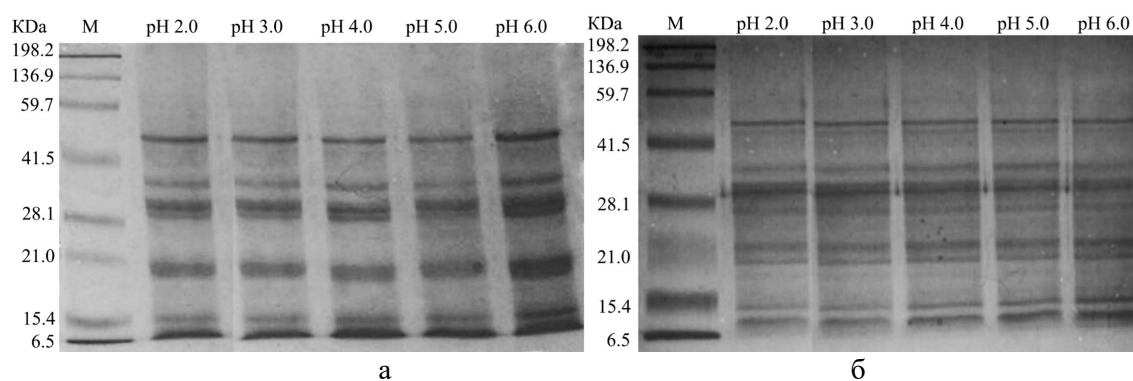


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ изолятов белка амаранта, полученных при pH 12.0:
 а – водная экстракция, б – солевая экстракция.

Fig. 1. PAGE of amaranth protein isolates obtained at the pH of 12.0:
 a – aqueous extraction, b – salt extraction.

и солевой экстракции при pH 12.0 и различных pH осаждения (рис. 1).

Электрофорез в ПААГ изолятов белка амаранта, показывает сложный профиль белков, что согласуется с литературными данными [12]. Белки с молекулярной массой от 6.5 до 54 кДа были обнаружены при всех pH осаждения (рис. 1), как при водной, так и при солевой экстракции. Установлено наличие в изолятах белков с молекулярной массой 54 кДа, соответствующих глютелину, а также белков с молекулярными массами 18-20 кДа, 20-36 кДа и 36-38 кДа, соответствующих 11S-глобулинам, и 41-45 кДа, соответствующих 7S – глобулинам. Белки с молекулярной массой менее 15.4 кДа, соответствующие альбуминам, также обнаружены с высокой экспрессией при всех значениях pH осаждения.

Для определения биологической ценности изолята белка амаранта, полученного при оптимальных условиях его выделения, был определен аминокислотный состав белка. В табл. 3 представлена сравнительная характеристика аминокислотного состава изолята белка амаранта и нативного белка семян амаранта.

В результате определения аминокислотного состава установлено, что основными аминокислотами белка семян амаранта являются аргинин, лизин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота,

пролин, лейцин. Данные табл. 3 показывают снижение количества метионина и цистеина в изоляте белка амаранта по сравнению с нативным белком, в количестве остальных аминокислот не выявлено значительных различий. При этом отмечается увеличение количества всех аминокислот на 100 г изолята белка, что позволяет использовать его для обогащения продуктов питания аминокислотами.

Снижение растворимости изолята белка амаранта в воде послужило основанием для исследования изменения фракционного состава изолята белка методом ИК-Фурье-спектроскопии (рис. 2). Из рис. 2 видно, что полосы поглощения идентифицированы в коротковолновой ($3600-2600\text{ см}^{-1}$) и длинноволновой ($1800-900\text{ см}^{-1}$) областях спектра. Первая полоса характерна для валентных колебаний C–H метильных и метиленовых фрагментов в области $2923-2933\text{ см}^{-1}$ и 2855 см^{-1} , а также валентных колебаний O–H и N–H в области $3280-3300\text{ см}^{-1}$. По данным ИК-Фурье-спектроскопии в спектрах поглощения установлены колебания COOH-групп (1746 см^{-1}), OH- и NH-групп (группа пиков около $2800-3300\text{ см}^{-1}$), а также CH_2 и CH_3 групп (2855 и 2922 см^{-1}) [13]. Необходимо отметить, что в образцах, полученных при осаждении в кислой среде, значительно сильнее выражены полосы колебаний COOH-группы, что, вероятно, связано с протонированием

Таблица 3. Аминокислотный состав белка семян амаранта и изолята белка амаранта
 Table 3 Amino acid composition of amaranth seed protein and amaranth protein isolate

Наименование аминокислоты	Содержание аминокислот, мг			
	на 1 г белка		на 100 г	
	семян амаранта	изолята	семян амаранта	изолята
Аргинин (Arg)	10.50	11.8	94.5	1062.10
Лизин (Lys)	5.23	6.25	47.01	562.50
Тирозин (Tyr)	3.63	4.81	32.85	432.90
Фенилаланин (Phe)	3.70	3.65	33.3	328.50
Гистидин (His)	2.13	2.89	19.7	260.10
Лейцин (Leu)	5.12	6.17	46.08	555.32
Изолейцин (Ileu)	2.13	2.09	19.17	188.11
Метионин (Met)	2.24	0.11	20.16	9.91
Валин (Val)	3.44	4.66	28.26	419.43
Пролин (Pro)	4.50	5.61	40.5	504.92
Треонин (Thr)	3.66	4.12	32.94	370.80
Серин (Ser)	6.65	6.98	59.85	628.21
Аланин (Ala)	3.56	4.75	32.04	427.55
Глицин (Gly)	7.34	8.94	66.09	804.60
Цистеин (Cys)	2.70	0.29	24.3	26.10
Глутаминовая кислота (Glu)	20.59	21.66	185.31	1949.42
Аспарагиновая кислота (Asp)	14.60	15.36	131.4	1314.01

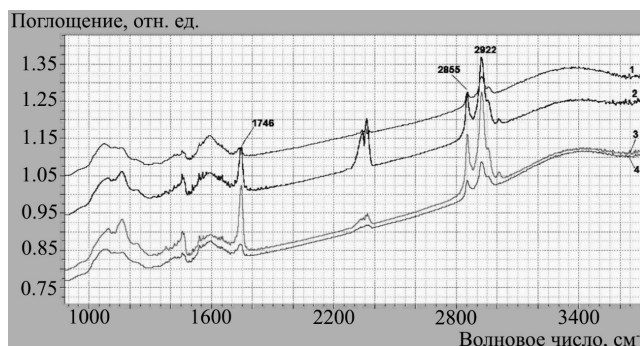


Рис. 2. ИК-Фурье спектры образцов белка амаранта, полученные при следующих условиях: 1 – щелочная экстракция (рН 12.0); 2 – щелочная экстракция и осаждение в присутствии HCl (рН 4.0); 3 – экстракция NaCl и осаждение в присутствии HCl (рН 4.0); 4 – щелочная экстракция в присутствии 0.1 М NaCl

Fig. 2. Fourier IR spectra of amaranth protein samples obtained under the following conditions: 1 – alkaline extraction (pH 12.0); 2 – alkaline extraction and precipitation in the presence of HCl (pH 4.0); 3 – NaCl extraction and precipitation in the presence of HCl (pH 4.0); 4 – alkaline extraction in the presence of 0.1M NaCl

карбоксильной группы в кислой среде. Также у данных образцов существенно сильнее выражены колебания метильных и метиленовых групп, что сопровождается уменьшением растворимости образца.

Заключение

Определены оптимальные условия выделения белка амаранта. Последовательная экстракция белка амаранта водой и 0.1M раствором NaCl при рН экстракции 12.0 с дальнейшим его осаждением из



экстракта при рН 4.0 позволяет достичь максимального выхода белка из обезжиренной муки амаранта и получить белковый изолят с массовой долей белка 90%. В полученных изолятах установлено наличие следующих фракций белков: альбумины, глобулины (7s и 11s-глобулины) и глютелины. При этом исключалось содержание проламинов в изоляте белка за счет их гидрофобности. Методом капиллярного электрофореза определено, что основными аминокислотами белка семян амаранта являются аргинин, лизин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, пролин, лейцин.

Отмечено снижение растворимости изолята белка в воде, что может быть связано с частичной денатурацией белка в

Список литературы/References

1. Kudinov P.I., Shchekoldina T.V., Slizkaya A.S., Current state and structure of world resources of vegetable protein. *Izvestiya vuzov. Food technology*. 2012; 4: 124-130. (In Russ.)
2. Kompantsev D.V., Popov I.M., Privalov E.F., Stepanova A.V. Protein isolates from vegetable raw materials: a review of the current state and analysis of the prospects for the development of technology for obtaining protein isolates from vegetable raw materials, *Modern problems of science and education*. 2016; 1. <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24132>.
3. Ferreira T.A., Gómez-Áreas J.A., Calcium bioavailability of raw and extruded amaranth grains. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2010; 30; 532-538. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000200037>
4. Repo-Carrasco-Valencia R., Hellstrom J.K., Pihlava J.M., Mattila P.H., Flavonoids and other phenolic compounds in andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chem*. 2010; 120 (1): 128-133.

процессе экстракции в высокощелочной среде и кислотном осаждении. Полученные данные не снижают биологическую ценность изолята белка амаранта и служат основанием для дальнейшего изучения свойств изолятов растительных белков с целью их практического применения.

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.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.087>

5. Aguilar E.G., Peiretti E.G., Uñates M.A., Marchevsky E.J., Escudero N.L., Camiña J.M. Amaranth seed varieties: A chemometric approach. *Food Measure*. 2013; 7: 199-206. <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9156-1>
6. Shmalko N.A., Roslyakov Yu.F. Amaranth in the food industry. Krasnodar: Enlightenment-South, 2011. 400 p.
7. Grobelnik-Mlakar S., Turinek M., Jakop M., Bavec M., Bavec F. Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making. *Agricultura*. 2009; 6: 43-53.
8. Awasthi C.P., Kumar A., Singh N., Thakur R. Biochemical composition of grain amaranth genotypes of himachalpradesh. *Indian. J. Agric. Biochem*. 2011; 24: 141-144.
9. Aceituno-Medina M., Lopez-Rubio A., Mendoza S., Lagaron J.M. Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthushypochondriacus*) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocolloids*. 2013; 31(2): 289-298.
10. Lado M.B., Burini J., Rinaldi G., Añón M.C., Tironi V.A., Effects of the Dietary Addition of Amaranth (*Amaranthus-mantegazzianus*). Protein Isolate on Antiox-



idant Status, Lipid Profiles and Blood Pressure of Rats. *Plant Food Hum. Nutr.* 2015; 70 (4); 371-379.

11. Stepanov K.V., Pirogov A.V., Dikunets M.A., Shpigun O.A. Obtaining amino acid phenylthiohydantoin for quantitative analysis of the amino acid composition of proteins by capillary electrophoresis. *Mess. Moscow University. Ser. 2. Chemistry.* 2005; 46(6): 395-399. (In Russ.)

12. Srivastava R, Roy B. Proteomic analysis of different extracts from amaranth (*Amaranthus tricolor*) grains. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013; 6: 37-39.

13. Derkanosova N.M., Stakhurlova A.A., Pshenichnaya I.A., Ponomareva I.N., Peregonchaya O.V., Sokolova S.A. Amaranth as a bread enriching ingredient. *Foods and Raw Materials.* 2020; 8(2): 223-231.

Информация об авторах / Information about the authors

О.Л. Мещерякова – доцент кафедры биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Л.И. Василенко – доцент кафедры биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

А.С. Губин – доцент кафедры технологии органических соединений, переработки полимеров и техносферной безопасности, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Т.В. Свиридова – доцент кафедры биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

О.С. Корнеева – заведующая кафедрой биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

O.L. Meshcheryakova – Associate Professor Department of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: gawshina@mail.ru

L.I. Vasilenko – Associate Professor Department of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: vli2008@ya.ru

A.S. Gubin – Associate Professor of the Department of Technology of Organic Compounds, Polymer Processing and Technosphere Safety, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: goubinne@mail.ru

T.V. Sviridova – Associate Professor Department of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: sviridovatv@yandex.ru

O.S. Korneeva – Head of Department of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 15.09.2022; одобрена после рецензирования 17.10.2022; принята к публикации 26.10.2022.

The article was submitted 15.09.2022; approved after reviewing 17.10.2022; accepted for publication 26.10.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10891

Исследование маршрута реакции 1,3-дифенил-1Н-пиразол-5-амин с N-(4-фторфенил)итаконимидом методом ВЭЖХ-МС

Яна Юрьевна Шмойлова¹✉, Данила Эдуардович Иванов¹,
Юрий Александрович Ковыгин¹, Хидмет Сафарович Шихалиев¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, shmoylovay@gmail.com✉

Аннотация. Современный рациональный дизайн структур органических соединений требует высокой эффективности вследствие необходимости одновременного повышения молекулярной сложности и минимизации числа стадий синтетических процедур. Эти проблемы становятся еще более значимыми при конструировании различных полиазагетероциклических матриц, в том числе с пиразолопиридиновым скелетом, являющимся одним из распространенных фрагментов в структурах природных и синтетических биологически активных соединений. Получение новых полизамещенных гетероциклических соединений – сложный многостадийный процесс, включающий как последовательные, так и параллельные стадии, осложняющие контроль реакции и выделение продуктов. Кроме этого, основной проблемой при исследовании каскадных реакций с использованием различных полинуклеофильных реагентов является определение очередности процессов, приводящих к целевым продуктам. Поэтому, актуальными являются задачи, связанные с изучением механизмов образования гетероциклических систем и идентификацией промежуточных соединений, возможность индивидуализации которых весьма затруднительна.

В настоящее время масс-спектрометрия является селективным, высокочувствительным и экспрессным методом для определения различных типов соединений в многокомпонентных пробах. Это позволяет применять высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС) в исследовании маршрутов сложных реакций для идентификации продуктов и интермедиатов. В отличие от широко применяющегося метода ТСХ, ВЭЖХ/МС даёт возможность предварительно оценить компоненты реакционной массы по масс-спектрометрическим данным.

Цель данного исследования – разработка эффективной методики контроля синтетического процесса между N-(4-фторфенил)итаконимидом 1 и 1,3-дифенил-1Н-пиразол-5-амин 2, для идентификации конечных продуктов и возможных промежуточных соединений. Взаимодействие между реагентами проводилось при кипячении в изопропиловом спирте в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты в течение нескольких часов. Пробы для хроматографирования отбирались из реакционной массы через определенные промежутки времени. При интерпретации результатов хроматографического анализа установлено, что в ходе реакции помимо ожидаемого N-(4-фторфенил)-2-(6-оксо-1,3-дифенил-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-ил)ацетамида 5 образуется 7-(4-фторфенил)-1,3-дифенил-4,4а,5,7-тетрагидропиразоло[3,4-*b*]пирроло[3,2-*e*]пиридин-6(1Н)-он 6. Показано, что в реакционной массе присутствуют два минорных компонента, очевидно являющиеся интермедиатами.

Ключевые слова: ВЭЖХ, масс-спектрометрия, арилитаконимид, 5-аминопиразол, рециклизация.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2022-2024 годы, проект № FZGU-2022-0003.

Для цитирования: Шмойлова Я.Ю., Иванов Д.Э., Ковыгин Ю.А., Шихалиев Х.С. Исследование маршрута реакции 1,3-дифенил-1Н-пиразол-5-амин с N-(4-фторфенил)итаконимидом методом ВЭЖХ-МС // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 849-855.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10891>



Original article

A study of the reaction route of 1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-amine with N-(4-fluorophenyl)itaconimide by HPLC-MS

Yana Yu. Shmoilova¹✉, Danil E. Ivanov¹, Yuri A. Kovygin¹, Khidmet S. Shikhaliev¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, shmoilovay@gmail.com✉

Abstract. The modern rational design of the structure of organic compounds needs to be highly efficient to allow both increasing molecular complexity and minimising the number of steps in synthetic procedures. These problems are even more relevant when designing various polyazaheterocyclic matrices, including those with a pyrazolopyridine backbone, which is one of the common fragments in the structures of natural and synthetic biologically active compounds. The preparation of new polysubstituted heterocyclic compounds is a complex multi-step process involving both consecutive and parallel steps that complicate the control of the reactions and product separation. In addition, the main problem associated with the study of cascade reactions using various polynucleophilic reagents is to determine the order of processes leading to the target products. Therefore, the problems associated with the study of the mechanisms of the formation of heterocyclic systems and the identification of intermediates, whose individualisation is very difficult, are relevant.

Currently, mass spectrometry is a selective, highly sensitive, and rapid method for determining different types of compounds in multi-component samples. This allows using high-performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry (HPLC/MS) to study routes of complex reactions to identify their products and intermediates. Unlike the widely used TLC method, HPLC/MS makes it possible to preliminarily estimate the components of the reaction mass from mass spectrometry data.

The purpose of this study is to develop an effective method for controlling the synthetic process between N-(4-fluorophenyl)itaconimide 1 and 1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-amine 2 to identify the final products and possible intermediates. The reaction with the reactants was carried out when boiled for several hours in isopropyl alcohol in the presence of catalytic amounts of acetic acid. Samples for chromatography were taken from the reaction mass at specified intervals. Interpretation of the chromatographic analysis results revealed that in addition to the expected N-(4-fluorophenyl)-2-(6-oxo-1,3-diphenyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)acetamide 5, 7-(4-fluorophenyl)-1,3-diphenyl-4,4a,5,7-tetrahydropyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,2-e]pyridin-6(1H)-one 6 was formed during the reaction. It was shown that the reaction mass had two minor components, which were obviously intermediates.

Keywords: HPLC, mass spectrometry, arylitaconimide, 5-aminopyrazole, recycling.

Acknowledgments: the work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of the government order to higher education institutions in the sphere of scientific research for years 2022-2024, project No. FZGU-2022-0003.

For citation: Shmoilova Ya.Yu., Ivanov D.E., Kovygin Yu.A., Shikhaliev Kh.S. A study of the reaction route of 1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-amine with N-(4-fluorophenyl)itaconimide by HPLC-MS. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 849-855. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10891>

Введение

Синтез полизамещённых гетероциклических систем – сложный многостадийный процесс, включающий как последовательные, так и параллельные стадии, осложняющие контроль реакции и выделение продуктов. Таким образом, актуальной задачей является разработка эффективных методов контроля этих синтетических процессов и установления структуры полученных продуктов. Для её решения необходимы сведения о строе-

нии промежуточных соединений, возможность индивидуализации которых весьма затруднительна. Однако использование метода ВЭЖХ/МС позволяет анализировать интермедиаты и конечные продукты реакций, проходящих в жидкой фазе, без выделения их из реакционной массы [1-5]. Гетероциклическая система пиразолопиридина, является основой структуры многочисленных биологически активных соединений. Так, среди производных пиразоло[3,4-*b*]пиридина обнаружены антагонисты аденозиновых

рецепторов A1 и ингибиторы киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3). Кроме того, производные пиразоло[3,4-*b*]пиридина находят применение в терапии ВИЧ, болезни Альцгеймера, наркомании, бесплодия [6-12]. Следует также отметить, что некоторые полиазагетероциклы применяются в качестве добавок в процессах электрохимического меднения [13-14].

В данной работе нами описана возможность использования метода ВЭЖХ/МС в качестве инструмента для исследования возможных интермедиатов взаимодействия *N*-арилитаконимида **1** с легкодоступными 1,3-дизамещенным-1*H*-пиразол-5-амином **2** (схема 1).

Экспериментальная часть

Общая методика синтеза *N*-(4-фторфенил)-2-(6-оксо-1,3-дифенил-4,5,6,7-тетрагидро-1*H*-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-ил)ацетамида **5** и 7-(4-фторфенил)-1,3-дифенил-4,4а,5,7-тетрагидропиразоло[3,4-*b*]пирроло[3,2-*e*]пиридин-6(1*H*)-она **6**. Раствор *N*-(4-фторфенил)-итаконимида **1** (25 ммоль) и 1,3-дифенил-1*H*-пиразол-5-амина **2** (25 ммоль) кипятили в изопропиловом спирте (50 см³) в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты в течение 10 часов. Образовавшийся осадок отфильтровали и перекристаллизовали из смеси метанола и ДМФА, 2:1 с выделением чистого **5**, фильтрат упарили и перекристаллизовали из метанола с выделением чистого **6**.

Анализ смесей осуществляли на приборе Agilent Technologies 1260 infinity (США) с масс-детектором Agilent 6230 TOF LC/MS (времяпролетный детектор масс высокого разрешения, производства США), метод ионизации – двойное электрораспыление (dual-ESI). Запись и регистрация сигналов проводилась в положительной полярности; небулайзер (N₂) 20 psig, газ-осушитель (N₂) 6 мл/мин, 325 °С; диапазон обнаружения масс составляет 50-2000 Дальтон. Напряжение на капилляре 4.0 кВ, фрагментаторе +191 В, скиммере +66 В, OctRF 750 В. Условия хроматографирования: колонка Poroshell 120 EC-C18 (4.6 x 50 мм; 2.7 мкм). Градиентное элюирование: ацетонитрил (А)/вода (Б) (0.1 % муравьиной кислоты) начало – А:Б = 60:40 в течение 1,5 мин, далее А 60 – 100% за 4 минуты, затем А – 100% до конца анализа; скорость потока 0.4 мл/мин. Программное обеспечение для обработки результатов исследований – MassHunter Workstation / Data Acquisition V.06.00.

Обсуждение результатов

Ввиду полифункциональности предшественников **1** и **2** в ходе реакции может образовываться несколько альтернативных продуктов. Ранее нами показано [15], что основным продуктом взаимодействия является полизамещенный пиразоло[3,4-*b*]пиридин **5**. Предполагаемый маршрут реакции включает несколько стадий: на

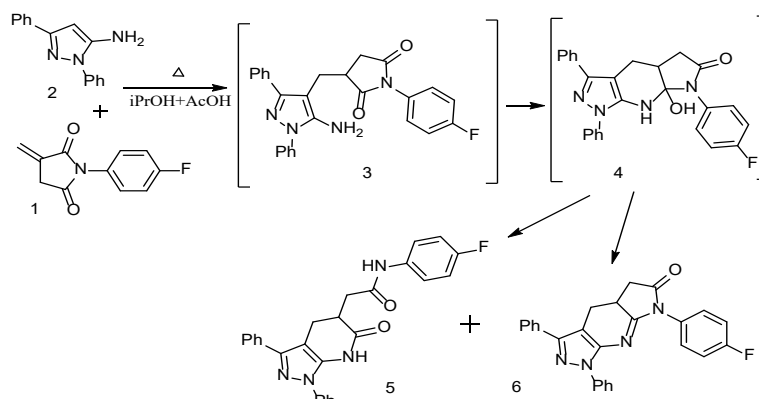


Схема 1. Целевая реакция процесса.
Scheme 1. Target reaction of the process.

первой стадии взаимодействия реализуется С-нуклеофильное присоединение по Михаэлю енамина по активированной кратной связи имида с образованием промежуточного линейного соединения **3**. Затем следует внутримолекулярное присоединение аминогруппы по имидной связи с образованием трициклического аддукта **4**. Который в свою очередь может рециклизоваться в соответствующий пиразоло[3,4-*b*]пиридин **5** или подвергнуться дегидратации без раскрытия цикла с образованием **6**.

Модельным процессом было выбрано взаимодействие итаконимида **1** и енамина **2** при кипячении в изопропиловом спирте в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты в течение нескольких часов. Пробы для хроматографирования объемом 0,05 мл отбирались из реакционной массы через определенные промежутки времени: 1, 10, 30, 60,

150, 300, 600 минут, при помощи автоматической пипетки (HTL lab solutions discovery comfort DV200/20-200 мкл) и разбавлялись ацетонитрилом (для ВЭЖХ) в 50 раз.

На приведенных ниже хроматограммах реакционной массы, (рис. 1-8), наряду с пиками исходных реагентов (**1** и **2**) можно увидеть пики продуктов реакции и возможных интермедиатов. На основании данных о реакционной способности 1,3-дифенил-1*H*-пиразол-5-амина **2** [15], нами были сделаны следующие выводы при интерпретации результатов хроматографического анализа.

При смешивании реагентов и кипячении в течение 1 минуты в реакционной массе помимо исходных реагентов **1** и **2** сразу появляются еще два пика **3** (сигнал при 2.777 мин.) и **4** (сигнал при 3.777 мин.) (рис. 6). В масс-спектре соединения

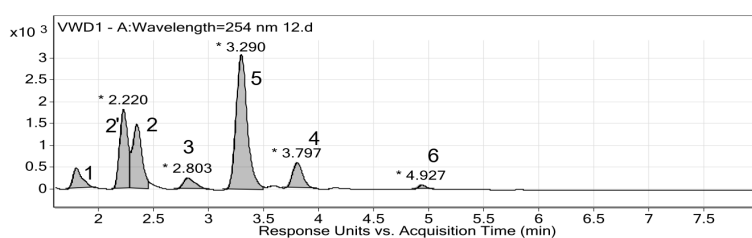


Рис. 1. Интегрированная сканированная хроматограмма реакционной смеси.
Время реакции 600 мин.

Fig. 1. Integrated scanned chromatogram of the reaction mixture. Response time: 600 min.

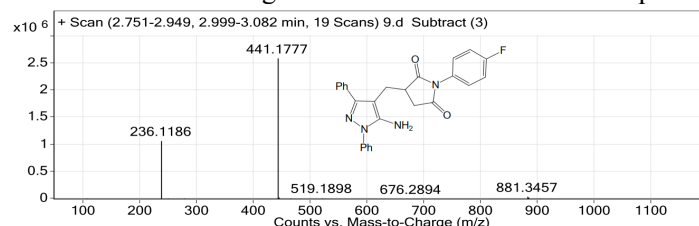


Рис. 2. Масс-спектр, соответствующий пику 3.
Fig. 2. Mass spectrum corresponding to peak 3.

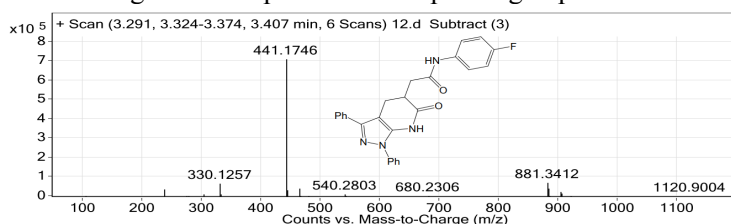


Рис. 3. Масс-спектр, соответствующий пику 5.
Fig. 3. Mass spectrum corresponding to peak 5.

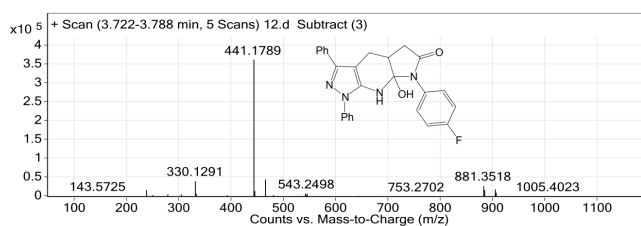


Рис. 4. Масс-спектр, соответствующий пику 4.

Fig. 4. Mass spectrum corresponding to peak 4.

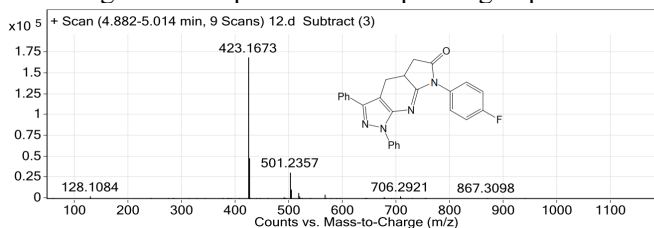


Рис. 5. Масс-спектр, соответствующий пику 6.

Fig. 5. Mass spectrum corresponding to peak 6.

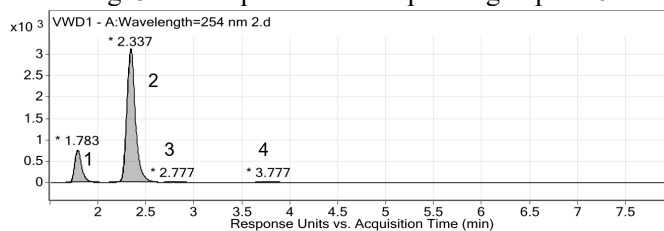


Рис. 6. Интегрированная сканированная хроматограмма реакционной смеси.

Время реакции 1 мин.

Fig. 6. Integrated scanned chromatogram of the reaction mixture. Response time: 1 min.

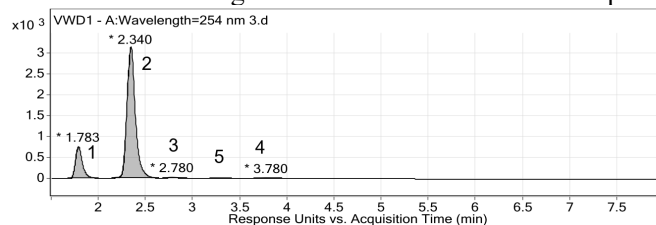


Рис. 7. Интегрированная сканированная хроматограмма реакционной смеси.

Время реакции 10 мин.

Fig. 7. Integrated scanned chromatogram of the reaction mixture. Response time: 10 min.

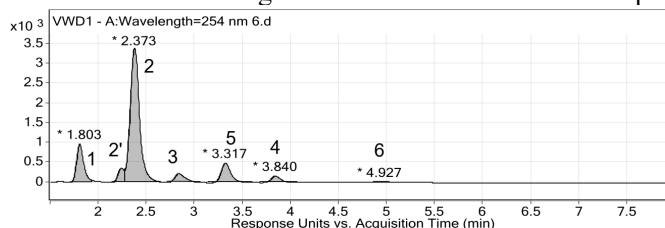


Рис. 8. Интегрированная сканированная хроматограмма реакционной смеси. Время реакции 60 мин.

Fig. 8. Integrated scanned chromatogram of the reaction mixture. Response time: 60 min.

3 (рис. 2) отмечается высокая интенсивность пика с массой 236, соответствующего исходному дифениламинопиразолу, в то время, как в спектре компонента **4** (рис. 4) и целевого пиразолопиридина **5**

(рис. 3) интенсивность данного пика существенно меньше. Это позволяет предположить, что компонент **3** является аддуктом Михаэля, а соединение **4** – циклическим интермедиатом трансамидирования.

В пробе, взятой по истечении 10 минут появляется еще один пик **5** (3.290 мин) (рис. 7). После 60 минут кипячения реакционной массы, на хроматограмме (рис. 8) значительно увеличивается площадь пика **5** и начинает появляться еще два пика: **2'**, отвечающий компоненту с массой молекулярного иона 278, вероятно являющемуся ацилированным аминопиразолом и пик альтернативного продукта **6** с массой молекулярного иона 423 (4.927 мин.).

По истечении 600 мин, преобладающим на хроматограмме (рис. 1) становится пик продукта **5**, причём при дальнейшем кипячении реакционной массы площадь его не увеличивается, что свидетельствует об окончании реакции.

Заключение

Таким образом, при помощи метода ВЭЖХ/МС установлено, что реакция

Список литературы/References

1. Medvedeva S.M., Shikhaliev Kh.S., Krylsky D.V., Gotsak I.V. New multicomponent method for the synthesis of polyhydrogenated pyrazino[1,2-a]quinolines. *Chemistry of heterocyclic compounds*. 2016; 52(5): 309-315. (In Russ.)

2. Shikhaliev Kh.S., Selemenev V.F., Medvedeva S.M., Ponomareva L.F. Mass-spectrometric analysis of 1-acyl-2,2,5-trimethyl-4,4-dichlorocyclopropane[c]quinolines. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2014; 14(2): 332-337. (In Russ.)

3. Polikarchuk V.A., Potapov A.Yu., Razumova V.E., Verezhnikov V.N., Shikhaliev Kh.S., Kostyukov V.F., Stolpovskaya N.V. HPLC-mass-spectrometric analysis of a three-component reaction with the participation of 4-hydroxy-2(1H)-quinolone and various aminoazoles. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2020; 20(6): 734-741. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/3141> (In Russ.)

между *N*-арилитаконимидом **1** и легкодоступным 1,3-дифенил-1*H*-пиразол-5-амином **2** протекает в течение 10 часов и приводит, через стадии образования интермедиатов **3** и **4** к образованию пиразолопиридина **5** и альтернативного пирролопиридинопиперазола **6**, очевидно, являющегося продуктом дегидратации общего для них интермедиата **4**. Данные о фрагментации промежуточных соединений позволяют предварительно приписать им структуры аддукта Михаэля и циклического интермедиата.

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.

4. Vandyshev D.Yu., Shikhaliev Kh.S., Potapov A.Yu., Krysin M.Yu., Kokonova A.V. Chromato-mass-spectrometric analysis of the reaction route between 1,2-diaminoimidazole and 1-aryl-3-(dimethylamino)prop-2-en-1-one. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2017; 17(3): 490-495. (In Russ.)

5. Manetti F., Schenone S., Bondavalli F., Brullo C., Bruno O., Ranise A., Botta M. Synthesis and 3D QSAR of new pyrazolo[3,4-b]pyridines: potent and selective inhibitors of A1 adenosine receptors. *J. of Med. Chem.* 2005; 48: 7172-7185. <https://doi.org/10.1021/jm050407k>

6. Falcó J.L., Lloveras M., Buiria I., Teixidó J., Borrell J.I., Guglietta A. Design, synthesis and biological activity of acyl substituted 3-amino-5-methyl-1, 4, 5, 7-tetrahydropyrazolo[3,4-b]pyridin-6-ones as potential hypnotic drugs. *Eur. J. Med. Chem.* 2005; 40: 1179-1187. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.06.008>

7. (a) Witherington, J., Bordas, V., Garland, S. L., Hickey, D. M., Ife, R. J., Liddle, J., Ward, R. W. 5-Aryl-pyrazolo[3,4-b]pyridines: potent inhibitors of glycogen



synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorganic medicinal chemistry letters*. 2003; 13(9): 1577-1580.

8. Chavva K., Pillalamarri S., Banda V., Gautham S., Gaddamedi J., Yedla P., Banda N. Synthesis and biological evaluation of novel alkyl amide functionalized trifluoromethyl substituted pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013; 23: 5893-5895. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.089>

9. Ghaedi A., Bardajee G.R., Mirshokrayi A., Mahdavi M., Shafiee A., Akbarzadeh T., Facile, novel and efficient synthesis of new pyrazolo[3,4-b]pyridine products from condensation of pyrazole-5-amine derivatives and activated carbonyl groups. *RSC Adv.* 2015; 5: 89652-89658. 5893-5895. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.089>

10. Hamblin J.N., Angell T.D, Ballantine S.P., Cook C.M., Cooper A.W., Dawson J.W. Pyrazolopyridines as a novel structural class of potent and selective PDE4 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008; 8: 4237-4241.

11. Tucker T.J., Jeffrey T.K., Yong Li Z., Nobuyoshi Y., Yangfeng Z. Patent W02009117278A2 2009.

12. Sharma P. K., Singh K., Kumar S., Kumar P., Dhawan S. N., Lal Dannhardt S. G. A close look into the biological and synthetic aspects of fused pyrazole derivatives. *Med. Chem. Res.* 2011; 20: 239-244.

13. Zhou J. Li, G., Hong Y., Wang C., W. He, S. Wang, Y. Chen, Z. Wen, Q. Wang. Copolymer of pyrrole and 1, 4-butanediol diglycidyl as an efficient additive leveler for through-hole copper electroplating. *ACS Omega.* 2020; 5(10): 4868-4874.

14. Yang S., Thacker Z., Allison E., Bennett M., N. Cole, P. Pinhero, Electrodeposition of copper for three-dimensional metamaterial fabrication. *ACS Applied Materials Interfaces.* 2017; 9(46): 40921-40929. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b04721>

15. Shmoylova Ya.Yu., Kovygin Yu.A., Kosheleva E.A., Shikhaliev K.S., Ledeneva I.V., Present M.A. Efficient synthesis of tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridines based on the recyclization of N-arylitacnionimides from aminopyrazoles. *Mendeleev Communications.* 2022; 32(5): 688-690. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.09.041>

Информация об авторах / Information about the authors

Я.Ю. Шмойлова – аспирант кафедры органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Д.Э. Иванов – студент кафедры органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Ю.А. Ковыгин – к.х.н., доцент кафедры органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Х.С. Шихалиев – д.х.н., профессор, заведующий кафедрой органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Ya.Yu. Shmoylova – postgraduate, Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, E-mail: shmoylovay@gmail.com

D.E. Ivanov – student, Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, E-mail: danila_ivanov_0000@mail.ru

Yu.A. Kovygin – Ph.D, Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, E-mail: kovygin@chem.vsu.ru

Kh.S. Shikhaliev – grand Ph.D, Professor, Head of the Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, E-mail: shikh1961@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 10.11.2022; одобрена после рецензирования 07.12.2022; принята к публикации 21.12.2022.

The article was submitted 10.11.2022; approved after reviewing 07.12.2022; accepted for publication 21.12.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723:577.112.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10892

Исследование сорбции аргинина сульфоэтилированным хитозаном с последующим определением методом капиллярного электрофореза

**Карина Радиковна Нурмухаметова^{1✉}, Елена Леонидовна Лебедева¹,
Юлия Сергеевна Петрова¹, Людмила Константиновна Неудачина¹**

¹Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия, nkarina99@mail.ru[✉]

Аннотация. Диагностика различных заболеваний и патологических состояний человека требует разработки экспрессных и чувствительных способов определения аминокислот. Одним из наиболее перспективных в этом отношении методов анализа является капиллярный электрофорез. Он позволяет осуществлять не только определение, но и разделение аминокислот, а также не требует использования токсичных и дорогостоящих реактивов.

Работа посвящена разработке методики электрофоретического определения аминокислот и исследованию сорбции аргинина сорбентом на основе сшитого глутаровым альдегидом N-2-сульфоэтилхитозаном со степенью сульфоэтилирования 1.0 (СЭХ 1.0).

Разработку методики электрофоретического разделения и определения аминокислот (аргинина, аланина, аминокислоты, аспарагина, аспарагиновой кислоты, валина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, лизина, лейцина, изолейцина, серина, орнитина, оксипролина, метионина, треонина, триптофана, фенилаланина, цистеина) проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105М». В результате проведенных исследований оптимизированы следующие условия разделения аминокислот: длина волны детектирования, температура, время гидродинамического ввода пробы, pH и природа фонового электролита, концентрация β-циклодекстрина. Разработанная методика позволяет осуществлять разделение и определение 13 аминокислот при их совместном присутствии в растворе и определение всех 20 исследуемых аминокислот при их индивидуальном присутствии в растворе. Рассчитаны значения пределов определения и пределов обнаружения исследуемых аминокислот методом капиллярного электрофореза в оптимизированных условиях.

Влияние pH аммиачно-ацетатного буферного раствора на сорбцию аргинина СЭХ 1.0 исследовано методом ограниченного объема при исходной концентрации аминокислоты $5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ (масса сорбента 0.05 г, объем раствора 10.0 см³). Установлено, что извлечение аминокислоты сорбентом является максимальным при pH 6.0 и составляет 44 %. Введение в исследуемый раствор эквимольного по отношению к аминокислоте количества ионов меди (II) не приводит к возрастанию степени извлечения аргинина. Степень извлечения аминокислоты СЭХ 1.0 в медной форме увеличивается с ростом pH и достигает максимального значения равного 85 % при pH 9.0. Равновесие сорбции аргинина сорбентом в медной форме при данном значении pH устанавливается в течение 2 часов контакта фаз.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, аминокислоты, аргинин, сорбция.

Благодарности: исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Программы развития Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина в соответствии с программой стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Для цитирования: Нурмухаметова К.Р., Лебедева Е.Л., Петрова Ю.С., Неудачина Л.К. Исследование сорбции аргинина сульфоэтилированным хитозаном с последующим определением методом капиллярного электрофореза // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 6. С. 856-868. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10892>



Original article

A study of arginine sorption by sulfoethylated chitosan followed by a capillary electrophoresis

Karina R. Nurmukhametova^{1✉}, Elena L. Lebedeva¹,
Yulia S. Petrova¹, Lyudmila K. Neudachina¹

¹Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation, nkarina99@mail.ru ✉

Abstract. Diagnostics of various human diseases and pathologies requires developing express and sensitive methods for determining amino acids. In this regard, one of the most promising analysis methods is capillary electrophoresis. It allows both determining and separating amino acids. What is more, it does not require toxic and expensive reagents.

The work is devoted to the development of a method for the electrophoretic determination of amino acids and the study of arginine sorption with a sorbent based on N-(2-sulfoethyl)chitosan cross-linked with glutaric aldehyde with a sulfoethylation degree of 1.0 (SEC 1.0).

The method of electrophoretic separation and amino acids determination (arginine, alanine, aminobutyric acid, asparagine, aspartic acid, valine, histidine, glycine, glutamic acid, lysine, leucine, isoleucine, serine, ornithine, oxyproline, methionine, threonine, tryptophan, phenylalanine, cysteine) was developed using a Kapel-105M capillary electrophoresis system. As a result of the studies, the following conditions for the separation of amino acids were optimised: detection wavelength, temperature, time of hydrodynamic sample injection, pH and the nature of the background electrolyte, and β -cyclodextrin concentration. The developed method allows separating and determining 13 amino acids in their joint presence in the solution and determining all the studied 20 amino acids when present individually in the solution. The values of the determination and detection limits were calculated for the amino acids studied by capillary electrophoresis under optimised conditions.

The effect of the pH of the ammonium-acetate buffer solution on arginine sorption by SEC 1.0 was studied by the method of limited volume at an initial concentration of amino acid of $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ (sorbent mass: 0.05 g, solution volume: 10.0 cm³). It was found that the extraction of the amino acid by the sorbent was maximum at pH 6.0 and was 44%. The introduction of an equimolar (in relation to amino acid) amount of copper (II) ions into the studied solution did not lead to an increase in the degree of arginine extraction. The extraction of the amino acid by SEC 1.0 in its copper form increased with an increase in the pH and reached the maximum value of 85% at pH 9.0. The equilibrium of arginine sorption by a sorbent in a copper form at the given pH value was established within 2 hours of phase contact.

Keywords: capillary electrophoresis, amino acids, arginine, sorption.

Acknowledgments: The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the Development Programme for the Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin in accordance with the Priority-2030 programme of academic strategic leadership. The research funding from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Ural Federal University Program of Development within the Priority-2030 Program) is gratefully acknowledged.

For citation: Nurmukhametova K.R., Lebedeva E.L., Petrova Yu.S., Neudachina L.K. A study of arginine sorption by sulfoethylated chitosan followed by a capillary electrophoresis. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2022. 22(6): 856-868. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10892>

Введение

Содержание аминокислот в биологических жидкостях человека и тканях организма человека в ряде случаев может являться важным диагностическим показателем [1]. По этой причине разработка простых, доступных и экспрессных методов их определения является важной задачей аналитической химии.

Аргинин – условно заменимая аминокислота, участвующая в синтезе полиаминов и креатина и являющаяся предшественником оксида азота (II) [2]. Для аргинина предложены самые разнообразные методы анализа: электрохимические, оптические и др. [3]. Учитывая то обстоятельство, что аминокислоты часто совместно присутствуют в лекарственных препаратах, продуктах питания, тканях

человека и животных, их биологических жидкостях, наибольшее значение при их определении в составе сложных по составу объектах приобретают методы анализа, позволяющие не только определять, но и разделять рассматриваемые аналиты, прежде всего ВЭЖХ и капиллярный электрофорез (КЭ). При этом последний выгодно отличается отсутствием необходимости использования токсичных органических растворителей и дорогостоящих хроматографических колонок, высокой эффективностью разделения, простотой аппаратного оформления [4]. Возможности данного метода в определенной степени ограничиваются более низкой его селективностью и чувствительностью по сравнению с ВЭЖХ [5]. Существующие методики [6-9] электрофоретического определения аминокислот позволяют осуществлять разделение порядка 11-17 аминокислот, некоторые из них характеризуются высокой длительностью анализа и предполагают использование токсичных органических растворителей [7, 8]. Это определяет необходимость оптимизации условий определения аминокислот методом КЭ, а также исследования возможности сорбционного разделения и концентрирования аминокислот на стадии пробоподготовки.

В качестве сорбентов для концентрирования аминокислот в течение последних 15 лет предложены синтетические органические катиониты [10] и аниониты [11, 12], ионообменные мембраны [13], неорганические материалы [14, 15], гибридные органо-неорганические сорбенты, способные образовывать комплексы по типу «гость – хозяин» [16]. Еще одним видом сорбентов для извлечения аминокислот и других органических соединений являются полиамфолиты. Согласно [17] этот класс материалов является перспективным для сорбции органических ионов из растворов с высокой ионной силой. Помимо этого, энергию их взаимодействия с органическими ионами

можно регулировать путем изменения степени ионизации сорбента.

Ранее [18] нами исследовано извлечение ионов металлов сорбентом на основе сшитого глутаровым альдегидом N-2-сульфоэтилхитозаном со степенью модифицирования сульфоэтильными группами, равной 1.0 (СЭХ 1.0). Данный материал является полиамфолитом: содержит в своем составе слабоосновные аминокислотные группы и сильнокислотные сульфогруппы, депротонированные во всем диапазоне pH. Возможность вступать в катионо- и анионообменные взаимодействия определяет перспективность использования СЭХ 1.0 для концентрирования аминокислот.

Цель работы – исследование сорбции аргинина СЭХ 1.0 с последующим определением аминокислоты методом капиллярного электрофореза. Достижение поставленной цели требовало решения следующих задач: 1) оптимизация условий электрофоретического определения аминокислот; 2) исследование влияния pH на сорбцию аргинина СЭХ 1.0.

Экспериментальная часть

Исходные растворы 20 аминокислот (аргинина, аланина, аминокислоты, аспарагина, аспарагиновой кислоты, валина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, лизина, лейцина, изолейцина, серина, орнитина, оксипролина, метионина, треонина, триптофана, фенилаланина, цистеина) с концентрацией 10^{-2} моль/дм³ готовили из реагентов квалификации не ниже х.ч. Растворы с меньшей концентрацией готовили разбавлением исходных.

Регистрацию электрофореграмм анализируемых растворов проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель-105М» (ГК «Люмэкс», Россия), снабженной немодифицированным кварцевым капилляром (внутренний диаметр 75 мкм, эффективная длина 50 см, общая длина 60 см), УФ-детектором и источни-



ком высокого напряжения. Пробу вводили гидродинамически в течение выбранного времени (от 5 до 20 с), при давлении 30 мбар. Анализ проводили при выбранной температуре водного термостатирования капилляра (от 20 до 35°C) и величине рабочего напряжения +25 кВ. Пробу анализировали при длине волны детектирования 190 нм. Между анализами капилляр промывали фоновым электролитом (ФЭ) в течение 3 минут. В качестве ФЭ использовали фосфатный (0.01 моль/дм³ фосфата) или тетраборатный (0.01 моль/дм³ Na₂B₄O₇) буферные растворы, а также тетраборатный ФЭ с добавлением β-циклодекстрина (β-ЦД). Необходимое значение pH ФЭ устанавливали, добавляя разбавленный раствор гидроксида натрия. Значение pH растворов контролировали с помощью лабораторного анализатора жидкости «АНИОН 4100» (ООО НПФ «Инфраспек-Аналит», Россия), снабженного стеклянным комбинированным электродом ЭСК-10601/7.

В качестве сорбента исследован хитозан со степенью сульфэтилирования 1.0, сшитый глутаровым альдегидом (СЭХ 1.0). Синтез и идентификация сорбента описаны в [18].

Сорбцию аргинина СЭХ 1.0 исследовали методом ограниченного объема в диапазоне pH 4.0-9.0, создаваемом аммиачно-ацетатным буферным раствором. Исходная концентрация аминокислоты составляла 5·10⁻⁵ моль/дм³, масса сорбента – 0.05 г, объем раствора – 10.0 см³. Время контакта фаз составляло 1, 3 и 5 ч. Концентрацию аргинина в растворах до и после сорбции определяли методом КЗЭ в оптимизированных условиях. По полученным данным рассчитывали значения степени извлечения аминокислоты (R, %) и сорбции (мкмоль/г). Сорбцию аргинина СЭХ 1.0 в присутствии ионов меди (II) исследовали в аналогичных условиях, концентрация сульфата меди (II) при этом составляла 5·10⁻⁵ моль/дм³.

В таких же условиях исследована сорбция аргинина СЭХ 1.0 в медной

форме. В медную форму СЭХ 1.0 переводили следующим образом: 0.05 г сорбента смешивали с 50.0 см³ 1 моль/дм³ раствора сульфата меди (II), оставляли на сутки при периодическом перемешивании, разделяли фазы фильтрованием, промывали СЭХ 1.0 на фильтре дистиллированной водой, оставляли сушиться на воздухе.

Обсуждение результатов

Первым этапом исследования была оптимизация условий электрофоретического разделения и определения исследуемых аминокислот в водных растворах. Для выбора оптимальной длины волны детектирования с помощью системы капиллярного электрофореза «Капель-105М» получены спектры поглощения водных растворов аминокислот с концентрацией 1·10⁻⁴ моль/дм³.

Для большинства исследуемых растворов аминокислот спектры поглощения имеют схожий вид. На рис. 1 в качестве примера приведены спектры триптофана, тирозина, серина, цистеина.

Спектры поглощения аланина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, аминокислот аргинина, валина, фенилаланина, орнитина, треонина имеют схожий вид со спектром серина, а спектры глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, оксипролина, изолейцина, лейцина, глицина имеют схожий вид со спектром цистеина. Большинство исследуемых аминокислот имеют низкие молярные коэффициенты поглощения в УФ-области спектра и лучше всего поглощают в диапазоне длин волн от 190 до 220 нм. Триптофан и тирозин, в свою очередь, способны поглощать вплоть до 275 нм. Также при необходимости селективного определения триптофана и тирозина на фоне всех остальных аминокислот можно выбрать длину волны 275 нм.

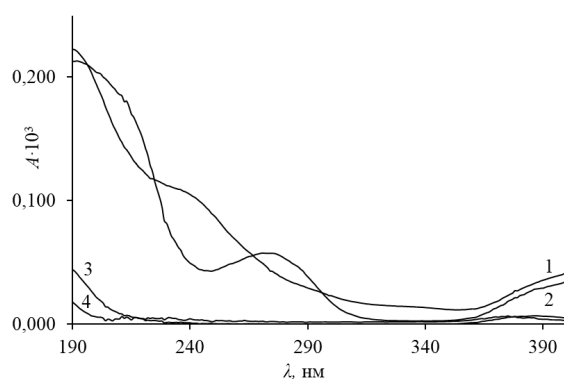


Рис. 1. Спектры поглощения водных растворов триптофана (1); тирозина (2); серина (3); цистеина (4) с концентрацией $1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³. Фон: дистиллированная вода
 Figure 1. Absorption spectra of aqueous solutions of tryptophan (1); tyrosine (2); serine (3); cysteine (4) with a concentration of $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Background: distilled water

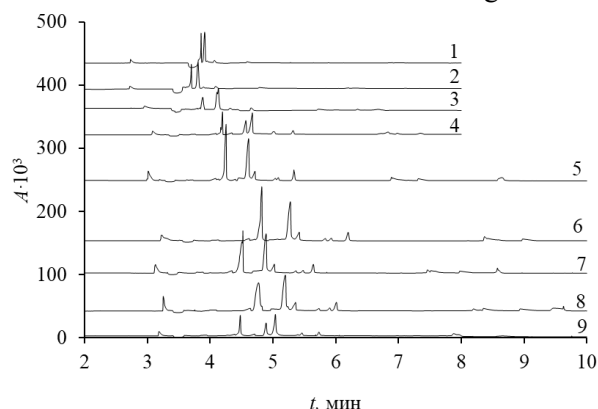


Рис. 2. ЭФГ смеси водных растворов 20 аминокислот ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³). Ввод пробы: 10 с, 30 мбар. $\lambda=190$ нм, $U=+25$ кВ, $T=25^\circ\text{C}$. Фоновый электролит: 0.01 моль/дм³ тетрабората натрия с рН 1) 8.0; 2) 8.5; 3) 9.0; 4) 9.5; 5) 9.6; 6) 9.7; 7) 9.8; 8) 9.9; 9) 10.0

Fig. 2. Electropherogram of a mixture of aqueous solutions of 20 amino acids ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Sample injection: 10 s, 30 mbar, $\lambda=190$ nm, $U=+25$ kV, $T=25^\circ\text{C}$. Background electrolyte: 0.01 mol/dm³ sodium tetraborate with a pH of 1) 8.0; 2) 8.5; 3) 9.0; 4) 9.5; 5) 9.6; 6) 9.7; 7) 9.8; 8) 9.9; 9) 10.0

Для дальнейших исследований выбрана длина волны 190 нм, соответствующая максимальным значениям светопоглощения всех 20 исследуемых аминокислот.

Для исследования влияния кислотности ФЭ на электрофоретическое поведение аминокислот в диапазоне рН 2.0-7.0 использовался фосфатный ФЭ, в диапазоне рН 8.0-10.0 – боратный ФЭ. В качестве примера на рис. 2 приведены ЭФГ смеси водных растворов аминокислот, полученные с использованием боратного ФЭ.

Установлено, что наилучшее разделение аминокислот достигается при значении рН 9.8-9.9. В этом случае на ЭФГ наблюдаются 10 отдельных пиков, в то время как при других значениях кислотности их число составляет 6-8. Для дальнейших исследований выбрано значение рН 9.8.

Согласно [19] для улучшения электрофоретического разделения аминокислот может использоваться β -ЦД, который способен образовывать с аминокислотами соединения типа «гость-хозяин».

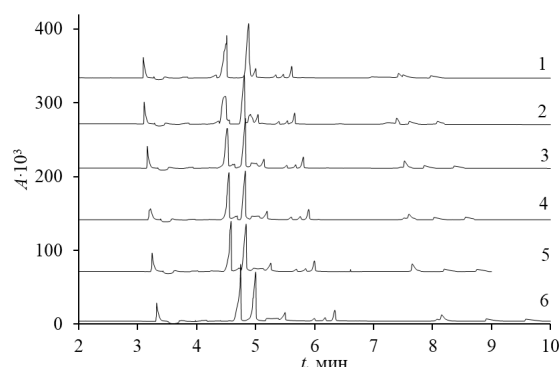


Рис. 3. ЭФГ смеси водных растворов 20 аминокислот ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³). Ввод пробы: 10 с, 30 мбар. $\lambda=190$ нм, $U=+25$ кВ, $T=25^\circ\text{C}$. Фоновый электролит: 0.01 моль/дм³ тетрабората натрия ($\text{pH}=9.8$), содержащий 1) 0; 2) 2; 3) 4; 4) 6; 5) 8; 6) 10 ммоль/дм³ β -ЦД

Fig. 3. Electropherogram of a mixture of aqueous solutions of 20 amino acids ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Sample introduction: 10 s, 30 mbar, $\lambda=190$ nm, $U=+25$ kV, $T=25^\circ\text{C}$. Background electrolyte: 0.01 mol/dm³ sodium tetraborate ($\text{pH}=9.8$) containing 1) 0; 2) 2; 3) 4; 4) 6; 5) 8; 6) 10 mmol/dm³ of β -CD

ЭФГ смеси водных растворов аминокислот, полученные с использованием боратного ФЭ, содержащего разные количества β -ЦД, приведены на рис. 3.

Установлено, что с увеличением концентрации β -ЦД в фоновом электролите вид ЭФГ изменяется и времена миграции АК растут. При концентрации 2 ммоль/дм³ появляются новые пики при 4.5 и 5 минутах, а при концентрации 6 ммоль/дм³ удается разделить пики лизина и аргинина. Однако, при концентрациях β -ЦД, равных 8 и 10 ммоль/дм³, пики лизина и аргинина снова появляются в виде одного пика. Поэтому в качестве оптимальной концентрации β -ЦД выбрано значение 6 ммоль/дм³, при котором удается разделить 13 аминокислот (валин, аргинин, аланин, триптофан, фенилаланин, метионин, треонин, серин, аспарагин, цистеин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лизин).

Влияние температуры на электрофоретическое разделение аминокислот в выбранных условиях исследовано в диапазоне 20-35 $^\circ\text{C}$. Установлено, что при повышении температуры от 20 до 30 $^\circ\text{C}$ пики становятся более узкими и высокими, что способствует более высокой чувствительности и селективности разделения аминокислот. При дальнейшем увеличении температуры до 35 $^\circ\text{C}$ пики

лизина, аргинина и глицина сливаются. Для дальнейших исследований выбрана температура 30 $^\circ\text{C}$.

Также исследовано влияние времени гидродинамического ввода пробы при постоянном давлении (30 мбар) на разделение аминокислот. Установлено, что при вводе пробы в течение 5 с наблюдаются настолько низкие пики, что количественное определение становится невозможным. При увеличении времени ввода пробы все пики растут, их разделение улучшается. В качестве оптимального значения времени ввода пробы нами выбрано время, равное 20 с.

Таким образом, в качестве оптимальных условий для разделения исследуемых аминокислот были выбраны следующие условия: тетраборатный фоновый электролит ($\text{pH}=9.8$) с добавлением β -ЦД ($6 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³), температура 30 $^\circ\text{C}$, ввод пробы при давлении 30 мбар в течение 20 с. ЭФГ смеси водных растворов аминокислот, полученная в данных условиях, приведена на рисунке 4.

Таким образом, на ЭФГ при данных условиях наблюдается 13 отдельных пиков аминокислот. Такие аминокислоты как глицин, оксипролин, орнитин, аминокислотная кислота, лейцин, изолейцин, гистидин, разделить не удастся. Для всех исследуемых аминокислот построены

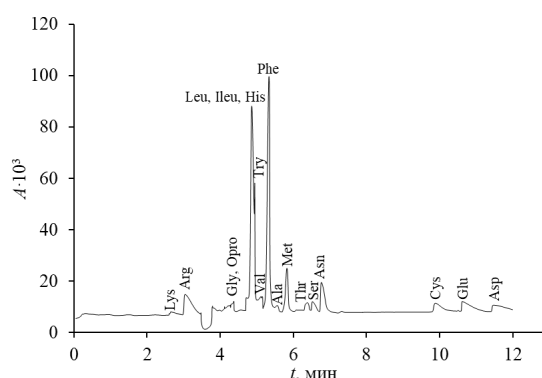


Рис. 4. ЭФГ смеси водных растворов АК ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³). Ввод пробы: 20 с, 30 мбар. $\lambda=190$ нм, $U=+25$ кВ, $T=30$ °С. Фоновый электролит: тетраборатный буферный раствор с концентрацией 0.01 моль/дм³, содержащий $6 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ β -ЦД

Fig. 4. Electropherogram of a mixture of aqueous solutions of AA ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Sample introduction: 20 s, 30 mbar, $\lambda=190$ nm, $U=+25$ kV, $T=30$ °C. Background electrolyte: tetraborate buffer solution with a concentration of 0.01 mol/dm³, containing $6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ of β -CD

Таблица 1. Значения диапазонов линейности градуировочных графиков, пределов обнаружения и пределов определения для исследуемых аминокислот

Table 1. Values of the linearity ranges of calibration curves, detection and determination limits for the studied amino acids

Аминокислота	Диапазон линейности, моль/дм ³	Предел обнаружения, моль/дм ³	Предел определения, моль/дм ³
Аланин	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$2.9 \cdot 10^{-6}$	$1.7 \cdot 10^{-5}$
Аминомасляная кислота	$1.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-6}$	$7.5 \cdot 10^{-6}$
Аргинин	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$3.7 \cdot 10^{-6}$	$6.5 \cdot 10^{-6}$
Аспарагин	$2.5 \cdot 10^{-5} - 5.0 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$	$6.0 \cdot 10^{-5}$
Аспарагиновая кислота	$1.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$4.0 \cdot 10^{-6}$	$2.9 \cdot 10^{-5}$
Валин	$1.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$
Гистидин	$2.5 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$
Глицин	$5.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-5}$	$2.9 \cdot 10^{-5}$
Глутаминовая кислота	$1.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$2.7 \cdot 10^{-5}$
Изолейцин	$5.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-2}$	$5.5 \cdot 10^{-5}$	$9.9 \cdot 10^{-5}$
Лейцин	$5.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-2}$	$4.8 \cdot 10^{-5}$	$7.1 \cdot 10^{-5}$
Лизин	$1.0 \cdot 10^{-4} - 1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$6.5 \cdot 10^{-4}$
Метионин	$7.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$8.5 \cdot 10^{-6}$	$1.6 \cdot 10^{-5}$
Оксипролин	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$	$2.8 \cdot 10^{-5}$
Орнитин	$8.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$2.2 \cdot 10^{-4}$
Серин	$2.5 \cdot 10^{-5} - 5.0 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$5.1 \cdot 10^{-5}$
Цистеин	$5.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$3.6 \cdot 10^{-6}$	$2.6 \cdot 10^{-5}$
Треонин	$5.0 \cdot 10^{-5} - 1.0 \cdot 10^{-3}$	$3.5 \cdot 10^{-5}$	$5.3 \cdot 10^{-5}$
Триптофан	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$4.0 \cdot 10^{-8}$	$4.7 \cdot 10^{-7}$
Фенилаланин	$2.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-6}$	$9.1 \cdot 10^{-6}$

градуировочные графики. Полученные при обработке градуировочных графиков значения диапазонов линейности градуировочных графиков, пределов обнаружения и пределов определения для исследуемых аминокислот приведены в табл. 1.

Для всех исследуемых аминокислот ЭФГ характеризуются достаточно хорошей прецизионностью: относительное значение стандартного отклонения для времен миграции аминокислоты не превышает 3%, для высоты (площади) – 5%.

В целом разработанная методика определения аминокислот характеризуется простотой, экспрессностью и низкой стоимостью анализа. Однако она не позволяет осуществлять разделение всех исследуемых аминокислот, что требует проведения их предварительного сорбционного разделения. Кроме этого, определение некоторых аминокислот характеризуется не очень высокой чувствительностью. Использование стадии концентрирования в данном случае может позволить понизить предел их определения.

Следующим этапом работы стало исследование сорбции аргинина сорбентом на основе хитозана – СЭХ 1.0. Выбор данной аминокислоты определялся, во-первых, малым временем ее выхода (экспрессностью определения), во-вторых, низким значением предела определения, позволяющим исследовать сорбцию при относительно невысоких концентрациях аминокислоты в растворе.

С целью выбора оптимальных условий сорбции аргинина исследовали изменение параметров пика аргинина на ЭФГ от возраста раствора аминокислоты. Установлено, что все параметры (высота, площадь, приведенная площадь) остаются стабильными по крайней мере в течение 5 часов.

Результаты исследования сорбции аргинина из аммиачно-ацетатного буферного раствора СЭХ 1.0 представлены на рис. 5. Наименьшие значения степени извлечения аминокислоты СЭХ 1.0 получены для времени контакта фаз, равном 1 ч. Это связано с тем, что для достижения равновесия сорбции требуется больше времени. Установлено, что зависимости степени извлечения аминокислоты, полученные через 3 и 5 часов контакта фаз, имеют схожий вид. А именно: сорбция аргинина СЭХ 1.0 возрастает при $\text{pH} > 4.0$, достигая максимального значения при $\text{pH} 6.0$. При дальнейшем увеличении pH наблюдается уменьшение сорбции аминокислоты.

В условиях эксперимента наиболее вероятным механизмом извлечения аминокислоты является электростатическое взаимодействие заряженных функциональных групп сорбента с заряженными группами аминокислоты. Согласно [20] преобладающей формой аргинина в диапазоне $\text{pH} 3.0-8.0$ является однократно протонированная форма H_2L^+ . Иными словами, аминогруппы в составе аргинина протонированы, а карбоксильная – депротонирована. Максимальные значения сорбции других аминокислот различными полиамфолитами [17, 21] также

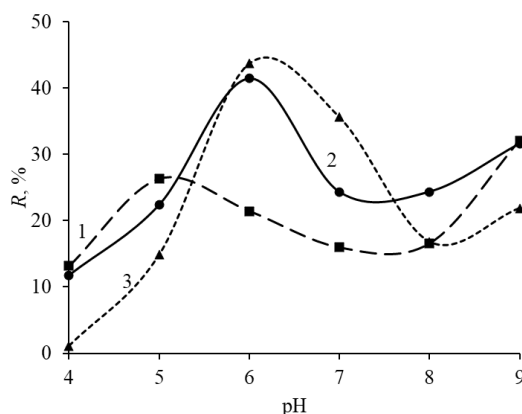


Рис. 5. Зависимость степени извлечения аргинина СЭХ 1.0 от pH аммиачно-ацетатного буферного раствора. Условия анализа: $g(\text{СЭХ } 1.0)=0.0500 \text{ г}$, $V=10 \text{ см}^3$,

$C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$; время контакта фаз 1) 1; 2) 3; 3) 5 ч.

Fig. 5. Dependence of the degree of arginine sorption by SEC 1.0 on the pH of the ammonium-acetate buffer solution. Analysis conditions: $g(\text{SEC } 1.0)=0.0500 \text{ g}$, $V=10 \text{ cm}^3$,

$C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; phase contact time: 1) 1; 2) 3; 3) 5 h.

наблюдаются при значениях рН, соответствующих нахождению их в растворе в виде биполярных ионов – частиц, несущих одновременно положительный и отрицательный заряд. Это обстоятельство объясняется тем, что сорбированные аминокислоты становятся дополнительными центрами сорбат-сорбатного взаимодействия с образованием ассоциатов между $-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$ группами.

В целом в условиях эксперимента значения степени извлечения аргинина не превышают 44%. В целях исследования возможности повышения сорбции аминокислоты СЭХ 1.0 изучена ее сорбция в присутствии эквимольного количества сульфата меди (II). Известно, что сорбенты на основе сульфэтилированных аминополимеров, в том числе СЭХ 1.0 [18], в наибольшей степени из растворов сложного состава извлекают ионы серебра (I) и в меньшей – ионы меди (II). Тем не менее, именно медь (II) выбрана для изучения возможности извлечения аргинина за счет смешаннолигандного комплексообразования. Во-первых, по причине более низкой стоимости солей меди (II) по сравнению с солями серебра (I), во-вторых, вследствие большей склонности серебра (I) вступать в окислительно-восстановительные реакции. Помимо этого, в соответствии с рядом Ирвинга – Вильямса [22] медь (II) по сравнению с другими двухзарядными ионами металлов образует наиболее устойчивые комплексы с N,O-содержащими лигандами, к которым относятся аминокислоты.

Установлено, что введение в раствор эквимольного по отношению к аргинину количества меди (II) не приводит к изменению характера зависимости сорбции аминокислоты СЭХ 1.0 и возрастанию степени ее извлечения. Это обстоятельство может быть связано с недостаточной для количественного связывания аминокислоты в устойчивый комплекс концентрацией данного иона и конкурентным комплексообразованием ионов меди (II) с аммиаком, который является

компонентом используемого буферного раствора. Следующим этапом исследования стало изучение сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме. Полученная зависимость представлена на рис. 6.

Установлено, что в условиях эксперимента степень извлечения аргинина возрастает с ростом рН аммиачно-ацетатного буферного раствора. Изменение характера зависимости сорбции аминокислоты от рН по сравнению с сорбцией СЭХ в натриевой форме связано с изменением преобладающего механизма процесса. Основным механизмом сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме является механизм смешаннолигандного комплексообразования: аминокислота извлекается за счет образования хелатных комплексов с медью (II), которая в свою очередь связана с функциональными аминио- и сульфогруппами в составе сорбента. С ростом рН увеличивается степень депротонирования аминогрупп в составе аргинина, увеличивается выход комплекса, образуемого медью (II) в фазе СЭХ 1.0 с аминокислотой, как следствие степень ее извлечения возрастает. Проведение сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме приводит к значительному возрастанию степени его извлечения вплоть до 85% при рН 9.0.

Как и при исследовании сорбции аргинина СЭХ 1.0 в натриевой форме, при проведении эксперимента с использованием сорбента в медной форме, зависимости, полученные при времени контакта фаз 3 и 5 часов, имеют схожий вид, степень извлечения аминокислоты при времени контакта фаз 1 час принимает меньшие значения. Для уточнения времени установления равновесия сорбции аминокислоты исследована кинетика ее сорбции СЭХ 1.0 при рН 9.0 в условиях, соответствующих максимальному значению степени извлечения. Полученная кинетическая кривая сорбции аргинина приведена на рис. 7.

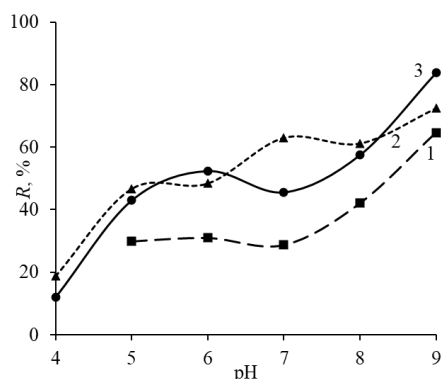


Рис. 6. Зависимость степени извлечения аргинина СЭХ 1.0 в медной форме от pH аммиачно-ацетатного буферного раствора.

Условия анализа: $g(\text{СЭХ 1.0})=0.0500 \text{ г}$, $V=10 \text{ см}^3$, $C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$; время контакта фаз 1) 1; 2) 3; 3) 5 ч.

Fig. 6. Dependence of the degree of extraction of arginine by SEC 1.0 in a copper form on the pH of the ammonium-acetate buffer solution. Analysis conditions:

$g(\text{SEC 1.0})=0.0500 \text{ g}$, $V=10 \text{ cm}^3$, $C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; phase contact time: 1) 1; 2) 3; 3) 5 h.

Установлено, что равновесие сорбции в условиях эксперимента устанавливается в течение 2 часов контакта фаз. Извлечение аминокислоты является количественным.

Заключение

Разработана простая, экспрессная методика электрофоретического разделения и определения 13 аминокислот, не требующая использования токсичных или дорогостоящих реактивов. Оценены значения пределов обнаружения и пределов определения аминокислот. Получены зависимости, характеризующие влияние pH аммиачно-ацетатного буферного раствора на сорбцию аргинина сорбентом на основе сульфэтилированного хитозана. Установлено, что в условиях эксперимента максимальная степень извлечения

Список литературы

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 2007. 704 с.
2. Palmer R.M.J., Feringe A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological

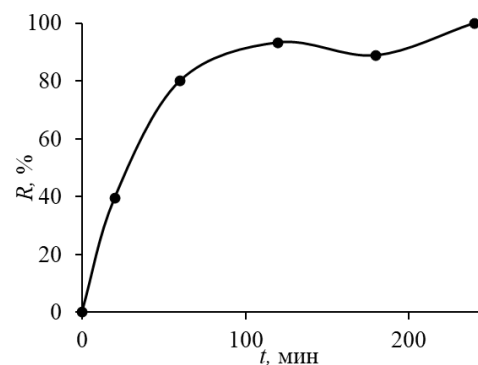


Рис. 7. Кинетическая кривая сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме. Условия эксперимента: $g(\text{СЭХ 1.0})=0.0500 \text{ г}$, $V=10.0 \text{ см}^3$, $C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$, pH 9.0, аммиачно-ацетатный буферный раствор.

Fig. 7. Kinetic curve of arginine sorption by SEC 1.0 in a copper form. Conditions of the experiment: $g(\text{SEC 1.0})=0.0500 \text{ g}$, $V=10.0 \text{ cm}^3$, $C_{\text{Arg}}=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, pH 9.0, ammonium-acetate buffer solution.

аминокислоты сорбентом достигается при pH 6.0 и составляет 44%. Показано, что существенно увеличить степень извлечения аргинина СЭХ 1.0 позволяет использование сорбента в медной форме. При этом сорбция увеличивается с ростом pH и составляет порядка 85% при pH 9.0. Равновесие сорбции аргинина СЭХ 1.0 в медной форме при данном значении pH устанавливается в течение 2 часов контакта 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.

activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature*. 1987. Vol. 327. no. 6122. P. 524-526.

3. Gajda G.Z., Stasjuk N.E., Gonchar M.V. The methods of L-arginine analysis // *Biotechnology Acta*. 2014. Vol. 7. no. 1. P. 31-39.



4. Карцова Л.А. Проблемы аналитической химии. Т. 18. Капиллярный электрофорез. М.: Наука, 2014. 444 с.
5. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». Санкт-Петербург: ООО «Веда», 2003. 202 с.
6. Манаенков О.В., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Экспресс-определение аминокислот методом капиллярного электрофореза без их предварительной дериватизации // *Журнал аналитической химии*. 2003. Т. 58, № 10. С. 1093-1096.
7. Мельников И.О., Глубоков Ю.М., Мосина А.Г., Назимов И.В. Патент РФ, № 2346931, 2009.
8. Мосина А.Г., Мельников И.О., Назимов И.В., Глубоков Ю.М. Капиллярный электрофорез немодифицированных генетически кодируемых аминокислот // *Журнал аналитической химии*. 2009. Т. 64, № 6. С. 655-659.
9. Chen Z.L., Warren C.R., Adams M.A. Separation of amino acids in plant tissue extracts by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection using aromatic carboxylates as background electrolytes // *Chromatographia*. 2000. Vol. 51. no 1. P. 180-187.
10. Бондарева Л.П., Корниенко Т.С., Овсянникова Д.В., Григорова Е.В. Сорбция ионов аминокислот фосфорнокислыми катионообменниками // *Вестник ВГУИТ*. 2014. № 4. С. 151-156.
11. Хохлова О.Н., Хохлов В.Ю., Лисицына С.А. Сорбция ароматических аминокислот на низкоосновных анионообменниках в непротонированной форме // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 1. С. 34-40.
12. Хохлова О.Н., Трошина П.В., Быковская А.И., Каширцева Е.Р., Хохлов В.Ю. Влияние различных факторов на необменную сорбцию аминокислот анионообменниками // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2021. Т. 21, № 4. С. 486-491.
13. Васильева В.И., Голева Е.А., Селемнев В.Ф. Особенности сорбции фенилаланина профилированными ионообменными мембранами // *Журнал физической химии*. 2016. Т. 90, № 10. С. 1548-1557.
14. Голованова О.А., Головченко К.К. Адсорбция аминокислот на поверхности брусита и гидроксилпатита // *Журнал физической химии*. 2019. Т. 93, № 11. С. 1714-1723.
15. Котова Д.Л., Крысанова Т.А., Васильева С.Ю., Бекетов Б.Н., Воркушин А.И. Кинетика сорбции алифатических аминокислот из водных растворов на клиноптилолите // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2015. Т. 15, № 3. С. 373-378.
16. Роик Н.В., Белякова Л.А., Дзязько М.А. Сорбция ароматических аминокислот на дисперсном кремнеземе, химически модифицированном β-циклодекстрином // *Хімія, фізика та технологія поверхні*. 2011. Т. 2, № 3. С. 314-324.
17. Бондарева Л.П. Особенности взаимодействия алифатических аминокислот с бифункциональным ионообменником // *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация*. 2015, № 4. С. 7-13.
18. Petrova Yu.S., Pestov A.V., Usoltseva M.K., Neudachina L.K. Selective adsorption of silver(I) ions over copper(II) ions on a sulfoethyl derivative of chitosan // *J. Hazard. Mater.* 2015. Vol. 299. P. 696-701.
19. ГОСТ Р 52347–2005 Комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания лизина, метионина, треонина, цистина и триптофана методом капиллярного электрофореза. М.: Стандартинформ, 2005. 16 с.
20. Лыткин А.И., Черников В.В., Крутова О.Н., Скворцов И.А., Корчагина А.С. Термодинамика кислотно-основных взаимодействий L-аргинина в водных растворах при 298.15 К // *Журнал физической химии*. 2018. Т. 92, № 2. С. 257-260.
21. Гапеев А.А., Бондарева Л.П., Астапов А.В., Корниенко Т.С. Гидратация и сорбция аминокислот иминофосфоновым ионообменником // *Физикохимия поверхности и защита материалов*. 2016. Т. 52, № 4. С. 436-441.
22. Irving H., Williams R.J.P. The stability of transition-metal complexes // *J. Chem. Soc.* 1953, pp. 3192-3210.

References

1. Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biologicheskaya khimiya*. M., Meditsina Publ., 2007, 704 p. (In Russ.)
2. Palmer R.M.J., Ferringe A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327(6122): 524-526. <https://doi.org/10.1038/327524a0>



3. Gajda G.Z., Stasjuk N.E., Gonchar M.V. The methods of l-arginine analysis, *Biotechnology Acta*. 2014; 7(1); 31-39. <https://doi.org/10.15407/biotech7.01.031>
4. Kartsova L.A. Problemy analiticheskoi khimii. Vol. 18. Kapillyarnyi elektroforez. M., Nauka Publ., 2014, 444 p. (In Russ.)
5. Komarova N.V., Kamentsev Ya.S. Prakticheskoe rukovodstvo po ispol'zovaniyu sistem kapillyarnogo elektroforeza «Kapel'». St.Petersburg, OOO «Veda», 2003. 202 p. (In Russ.)
6. Manaenkov O.V., Sidorov A.I., Sul'man E.M. Ekspress-opredelenie aminokislot metodom kapillyarnogo elektroforeza bez ikh predvaritel'noi derivatizatsii. *J. of Analytical chemistry*. 2003; 58(10): 1093-1096.
7. Mel'nikov I.O., Glubokov Yu.M., Mosina A.G., Nazimov I.V. Patent RF, no 2346931, 2009. (In Russ.)
8. Mosina A.G., Mel'nikov I.O., Nazimov I.V., Glubokov Yu.M. Kapillyarnyi elektroforez nemodifitsirovannykh geneticheski kodiruemyykh aminokislot. *J. of Analytical chemistry*. 2009; 64(6): 655-659.
9. Chen Z. L., Warren C. R., Adams M. A. Separation of amino acids in plant tissue extracts by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection using aromatic carboxylates as background electrolytes. *Chromatographia*. 2000; 51(1): 180-187. <https://doi.org/10.1007/BF02490562>
10. Bondareva L.P., Kornienko T.S., Ovsyanikova D.V., Grigorova E.V. Sorbtsiya ionov aminokislot fosfornokislymi kationoobmennikami. *Vestnik VGUIT*. 2014; 4: 151-156. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2014-4-151-156> (In Russ.)
11. Khokhlova O.N., Khokhlov V.Yu., Lisitsyna S.A. Sorbtsiya aromaticeskikh aminokislot na nizkoosnovnykh anionoobmennikakh v neprotonirovannoi forme. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022; 22(1): 34-40. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9018> (In Russ.)
12. Khokhlova O.N., Troshina P.V., Bykovskaya A.I., Kashirtseva E.R., Khokhlov V.Yu. Vliyanie razlichnykh faktorov na neobmennuyu sorbtsiyu aminokislot anionoobmennikami. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2021; 21(4); 486-491. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3632> (In Russ.)
13. Vasil'eva V.I., Goleva E.A., Selemenev V.F. Osobennosti sorbtsii fenilalanina profilirovannymi ionoobmennymi membranami. *J. of Physical Chemistry*. 2016; 90(10): 1548-1557. <https://doi.org/10.7868/S0044453716100277> (In Russ.)
14. Golovanova O.A., Golovchenko K.K. Adsorbtsiya aminokislot na poverkhnosti brushita i gidroksilapatita. *J. of Physical Chemistry*. 2019; 93(11): 1714-1723. <https://doi.org/10.1134/S0044453719110116> (In Russ.)
15. Kotova D.L., Krysanova T.A., Vasil'eva S.Yu., Beketov B.N., Vorkushin A.I. Kinetika sorbtsii alifaticheskikh aminokislot iz vodnykh rastvorov na klinoptilolite. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2015; 15(3): 373-378. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2015.15/284> (In Russ.)
16. Roik N.V., Belyakova L.A., Dzyaz'ko M.A. Sorbtsiya aromaticeskikh aminokislot na dispersnom kremnezeme, khimicheski modifitsirovannom β -tsiklodekstrinom. *Chemistry, Physics and Technology of Surface*. 2011; 2(3): 314-324. (In Russ.)
17. Bondareva L.P. Osobennosti vzaimodeistviya alifaticheskikh aminokislot s bifunktsional'nym ionoobmennikom. *Vestnik VGU, ser.: Chemistry, Biology, Pharmacy*. 2015; 4: 7-13. (In Russ.)
18. GOST R 52347-2005 Kombikorma, kombikormovoe syr'e. Opredelenie soderzhaniya lizina, metionina, treonina, tsistina i triptofana metodom kapillyarnogo elektroforeza. M. Standartinform. 2005, 16 p.
19. Lytkin A.I., Chernikov V.V., Krutova O.N., Skvortsov I.A., Korchagina A.S. Termodinamika kislotno-osnovnykh vzaimodeistvii L-arginina v vodnykh rastvorakh pri 298.15 K. *J. of Physical Chemistry*. 2018; 92(2): 257-260. <https://doi.org/10.7868/S0044453718020164> (In Russ.)
20. Gapeev A.A., Bondareva L.P., Astapov A.V., Kornienko T.S. Gidratatsiya i sorbtsiya aminokislot iminofosfonovym ionoobmennikom. *Physico-chemistry of Surfaces and Materials Protection*. 2016; 52(4): 436-441. <https://doi.org/10.7868/S0044185616040112> (In Russ.)
21. Irving H., Williams R.J.P. The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc.* 1953: 3192-3210. <https://doi.org/10.1039/JR9530003192>



Информация об авторах / Information about the authors

К.Р. Нурмухаметова – студент кафедры аналитической химии и химии окружающей среды института естественных наук и математики, Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Е.Л. Лебедева – доцент кафедры аналитической химии и химии окружающей среды института естественных наук и математики, к.х.н., Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Ю.С. Петрова – доцент кафедры аналитической химии и химии окружающей среды института естественных наук и математики, к.х.н., доцент, Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Л.К. Неудачина – заведующий кафедрой аналитической химии и химии окружающей среды института естественных наук и математики, к.х.н., доцент, Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Nurmukhametova Karina R. – student, department of analytical and environmental chemistry of the Institute of natural sciences and mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation, e-mail: nkarina99@mail.ru

E.L. Lebedeva – Ph. D. (chemistry), associate prof., department of analytical and environmental chemistry of the Institute of natural sciences and mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Yu.S. Petrova – Ph. D. (chemistry), associate prof., department of analytical and environmental chemistry of the Institute of natural sciences and mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

L.K. Neudachina – Ph. D. (chemistry), Head of the department of analytical and environmental chemistry of the Institute of natural sciences and mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 30.09.2022; одобрена после рецензирования 12.12.2022; принята к публикации 14.12.2022.

The article was submitted 30.09.2022; approved after reviewing 12.12.2022; accepted for publication 14.12.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.151: 612.352.3: 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10893

Применение ионообменной хроматографии для очистки глутатионредуктазы из печени крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени для исследования некоторых каталитических свойств

Светлана Евгеньевна Кравцова¹✉,

Татьяна Николаевна Попова¹, Евгений Дмитриевич Крыльский¹,

Лариса Владимировна Матасова¹, Юлия Игоревна Лебедева¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, vip.sveta.popova@mail.ru✉

Аннотация. Целью работы явилось исследование активности глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.8.1.7.) при парацетамол-индуцированном поражении печени (ППП), а также выделение и очистка фермента с использованием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии для оценки некоторых каталитических и регуляторных свойств. ППП моделировали путем однократного перорального введения ацетаминофена самцам белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) Wistar в дозе 1000 мг/кг массы тела, растворенного в 1 см³ вазелинового масла. Животные контрольной группы получали вазелиновое масло. Активность ГР определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Очистку фермента из печени крыс осуществляли с помощью фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через сефадекс G-25, а также ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Общее количество белка в пробах определяли при помощи набора BSA protein assay kit. В ходе работы была получена ГР из печени крыс с ППП со степенью очистки 33.3. С использованием метода двойных обратных координат Лайнуивера-Берка показано, что введение крысам парацетамола сопровождалось увеличением сродства фермента к НАДФН. Добавление в реакционную среду изоцитрата и глюкозо-6-фосфата, являющихся субстратами ферментов-поставщиков НАДФН для восстановления окисленного глутатиона, способствовало более выраженной активации ГР из печени животных с ППП по сравнению с контрольной группой. Наблюдаемое возрастание активности ГР при добавлении изоцитрата и глюкозо-6-фосфата было, по-видимому, связано с дополнительным активирующим действием данных соединений на фермент, реализующимся в условиях окисления восстановленного глутатиона при ППП. В то же время, введение в среду спектрофотометрирования цитрата приводило к более существенному снижению активности ГР относительно контрольных показателей. Наблюдаемые изменения свойств фермента могли быть связаны с наличием у цитрата антиоксидантных свойств, снижающих интенсивность свободнорадикального окисления при ППП. Таким образом, путём фракционирования, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе был получен очищенный препарат ГР из печени крыс с ППП, для которого продемонстрировано увеличение сродства к НАДФН и изменение регуляции активности под действием цитрата, изоцитрата и глюкозо-6-фосфата.

Ключевые слова: глутатионредуктаза, парацетамол-индуцированное поражение печени, окислительный стресс, ионообменная хроматография.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00526 А).

Для цитирования: Кравцова С.Е., Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Матасова Л.В. Лебедева Ю.И. Применение ионообменной хроматографии для очистки глутатионредуктазы из печени крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени для исследования некоторых каталитических свойств // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 869-876.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10893>

Original article

Using ion-exchange chromatography to purify glutathione reductase from the liver of rats with paracetamol-induced liver disease to investigate some catalytic properties

Svetlana E. Kravtsova^{1✉}, Tatyana N. Popova¹, Evgenii D. Kryl'skii¹,
Larisa V. Matasova¹, Yuliya I. Lebedeva¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, vip.sveta.popova@mail.ru[✉]

Abstract. The purpose of the work was to study the activity of glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7.) in case of paracetamol-induced liver disease (PLD) and to isolate and purify the enzyme using gel filtration and ion-exchange chromatography to evaluate some catalytic and regulatory properties. PLD was simulated by a single oral administration of acetaminophen to white male laboratory Wistar rats (*Rattus norvegicus*). The dosage was 1000 mg/kg of rat's weight in 1 cm³ of paraffinic oil. Animals of the control group were given paraffinic oil. The activity of GR was determined spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm. The purification of the enzyme from the liver of rats was carried out using fractionation with ammonium sulphate, gel filtration through Sephadex G-25, and ion exchange chromatography through DEAE-cellulose. The total amount of protein in the samples was determined using the BCA protein assay kit. As a result, GR was obtained from the liver of rats with PLD with a purification degree of 33.3. Using the Lineweaver–Burk method of double inverse coordinates, it was shown that the administration of paracetamol to rats was accompanied by an increase in the affinity of the enzyme for NADPH. The addition to the reaction medium of isocitrate and glucose-6-phosphate, which are substrates of enzymes supplying NADPH for the reduction of oxidised glutathione, contributed to a more pronounced activation of GR from the liver of animals with PLD as compared to the control group. The observed increase in GR activity with the addition of isocitrate and glucose-6-phosphate was apparently associated with an additional activating effect of these compounds on the enzyme, which occurred under the conditions of oxidation of reduced glutathione in the case of PLD. At the same time, the introduction of citrate into the spectrophotometry media led to a more significant decrease in GR activity relative to the control values. The observed changes in the enzyme properties could be associated with antioxidant properties of the citrate, which reduced the intensity of free radical oxidation in the case of PLD. Therefore, fractionation, gel filtration, and ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose were used to obtain a purified GR preparation from the liver of rats with PLD which demonstrated an increase in affinity for NADPH and a change in the activity regulation under the action of citrate, isocitrate, and glucose-6-phosphate.

Keywords: glutathione reductase, paracetamol-induced liver disease, oxidative stress, ion exchange chromatography.

Acknowledgments: the reported study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No.20-04-00526 A).

For citation: Kravtsova S.E., Popova T.N., Kryl'skii E.D., Matasova L.V., Lebedeva Yu.I. Using ion-exchange chromatography to purify glutathione reductase from the liver of rats with paracetamol-induced liver disease to investigate some catalytic properties. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 869-876. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10893>

Введение

В настоящее время количество людей с патологиями печени неуклонно растёт, основной причиной этого выступает увеличение метаболической нагрузки на данный орган, в том числе, вследствие избыточного поступления лекарственных препаратов [1]. Токсическое действие ксенобиотиков и их метаболитов приводит к поражению печени, которое сопро-

вождается воспалительной реакцией, цитолизом и развитием фиброза и цирроза [2]. Множество исследований подтверждают, что в патогенезе заболеваний печени ведущую роль играет окислительный стресс [3]. Как известно, метаболизм широкого ряда лекарственных препаратов сопровождается избыточным образованием реактивных молекул, что характерно, в том числе, для парацетамола



(ацетаминофена), широко используемого для моделирования лекарственных повреждений печени [4]. Обезвреживание высоких концентраций данного ксенобиотика в печени осуществляется с непосредственным участием восстановленного глутатиона (GSH) – ключевого компонента неферментативного звена антиоксидантной системы. При этом, в случае избыточного поступления в организм парацетамола развивается истощение запасов GSH, что приводит к накоплению свободных радикалов, способных повреждать необходимые для жизнедеятельности биомолекулы гепатоцитов [5]. Превращение окисленного глутатиона в восстановленную форму обеспечивается благодаря функционированию ГР за счет окисления НАДФН [6]. ГР является флавиновым ферментом и относится к семейству нуклеотиддисульфидных оксидоредуктаз. По субъединичному строению ГР представляет из себя гомодимер, причём субстрат-связывающие сайты и общая первичная структура различных изоформ фермента чрезвычайно консервативны. ГР играет центральную роль в регуляции клеточного редокс-гомеостаза за счёт поддержания необходимого уровня GSH у представителей различных таксономических групп [7]. Таким образом, представляет интерес исследование регуляторных и каталитических свойств ГР печени в условиях нарушения оксидативного статуса, вызванного введением парацетамола. Для анализа физико-химических аспектов функционирования ферментов требуется их получение в очищенном состоянии. Для этой цели в современной биохимии наиболее широко применяются различные виды колоночной хроматографии.

Исходя из этого, целью настоящей работы явилась очистка ГР с использованием ионообменной и гель-хроматографии, исследование её сродства к НАДФН, а также анализ регуляторного воздействия цитрата, изоцитрата и глю-

козо-6-фосфата на данный фермент из печени крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП).

Экспериментальная часть

Объектом исследования выступали самцы белых лабораторных крыс Wistar массой 200-250 г (Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Россия, Московская обл.). Все манипуляции были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010) и санитарными нормами вивариев (ГОСТ 33216-2014). В ходе эксперимента крысы были разделены на 2 группы: 1 группа (n=8) состояла из контрольных животных, которые содержались на стандартном режиме вивария и получали перорально вазелиновое масло; 2 группа (n=8) включала крыс с ППП, которое моделировали путем перорального введения ацетаминофена, растворенного в 1 см³ вазелинового масла, в дозе 1000 мг/кг массы тела животного [8]. Печень наркотизированных животных забирали через 24 часа после введения парацетамола. Ткань печени гомогенизировали в 4-х кратном объеме среды выделения, содержащей 0.05 М трис-HCl буфер (pH=7.8), 1мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол, после чего гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали для дальнейших исследований.

Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови крыс оценивали с помощью диагностических наборов фирмы Ольвекс (Россия). Скорость ГР реакции оценивали спектрофотометрически при длине волны 340 нм [9]. В основе метода лежало падение оптической плотности в результате окисления НАДФН. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата

за 1 минуту при 25°C. Активность фермента выражали в виде удельной активности. Среда спектрофотометрирования для ГР которая имела следующий состав: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.4), содержащий 1мМ ЭДТА, 0.16 мМ НАДФН, 0.85 мМ GSH. Концентрацию белка определяли с помощью коммерческого набора BSA protein assay kit (BioVision, США).

Использовалась следующая схема очистки для получения ферментных препаратов ГР. Разделение белков проводили сульфатом аммония ((NH₄)₂SO₄). Для этого использовали ступенчатое повышение концентрации фракционирующего агента в гомогенате от 0 до 40%, затем от 40 до 70%. С помощью гель-фильтрации через сефадекс G-25 (1.7×20 см) проводили дальнейшую очистку. Образец наносили в количестве не более 20-25% от объёма колонки. Калий-фосфатный буфер (pH 7.4) 0.01 М использовали в качестве элюирующей среды. Скорость элюции составляла 25-30 см³/ч. Ферментативную активность оценивали в каждой фракции объёмом 2 см³. Фракции, характеризующиеся максимальной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки с использованием ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (1.2×13см). После сорбции белка использовали градиент концентрации KCl в среде элюции для десорбции ГР. Скорость элюции составляла 20-25 см³/час. Ферментативную активность и содержание белка анализировали в каждой фракции, объёмом 2 см³. Фракции с максимальной активностью фермента объединяли. Все этапы выделе-

ния и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Константу Михаэлиса (K_m) определяли методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка.

Опыты проводили в 8-кратных биологических и 2-кратных аналитических повторностях. Результаты обрабатывали с применением методов описательной статистики путём определения выборочного среднего, выборочного стандартного отклонения, стандартной ошибки среднего. Нормальность распределения значений в группах анализировалось с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Результаты работы оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при p<0.05.

Обсуждение результатов

Проведённые исследования показали, что внутрижелудочное введение животным парацетамола в дозе 1000 мг/кг приводило к возрастанию активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови, что подтверждало развитие ППП (таблица 1). На первом этапе очистки ГР из печени животных с ППП, осуществляемом путём фракционирования с помощью ступенчатого повышения концентрации (NH₄)₂SO₄, удалось получить ферментный препарат, очищенный в 2.5 раза (таблица 2). На следующем этапе очистку ГР проводили с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-25 с целью удаления низкомолекулярных примесей. Дальнейшую очистку фермента осуществляли на ДЭАЭ-целлюлозе, в результате чего удалось получить ферментный препарат со

Таблица 1 Маркерные показатели цитолиза гепатоцитов в сыворотке крови крыс контрольной группы (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным повреждением печени (Парацетамол).

Table 1 Marker indices of hepatocyte cytolysis in the blood serum of rats of the control group (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

Показатель	Контроль	Парацетамол
Активность аланинаминотрансферазы, Е/дм ³	0.257±0.012	0.524±0.026
Активность аспартатаминотрансферазы, Е/дм ³	0.245±0.011	0.443±0.022

Таблица 2. Очистка глутатионредуктазы из печени крыс контрольной групп (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным повреждением печени (Парацетамол).
 Table 2. Purification of glutathione reductase from the liver of control rats (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

Стадия очистки	Условия	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	Контроль	2.67±0.11	243.1±9.66	0.011±0.001	100	1
	Парацетамол	6.98±0.35	415.3±20.81	0.017±0.001	100	1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	Контроль	2.44±0.09	198.2±9.85	0.013±0.001	91	1.2
	Парацетамол	2.56±0.13	45.1±2.26	0.043±0.002	37	2.5
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Контроль	2.29±0.08	115.0±5.77	0.020±0.001	86	1.8
	Парацетамол	1.52±0.08	37.8±1.91	0.047±0.003	22	2.7
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Контроль	1.21±0.04	1.9±0.08	0.600±0.027	45	54.5
	Парацетамол	1.05±0.03	9.7±0.52	0.575±0.030	15	33.3

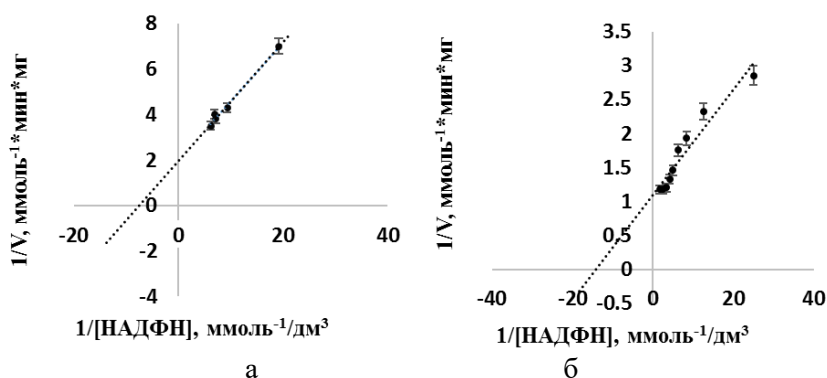


Рис. 1. Представленная в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка зависимость скорости реакции, катализируемой глутатионредуктазой, от концентрации НАДФН, у животных контрольной группы (а) и крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени (б).

Fig. 1. Dependence (shown using the Lineweaver–Burk method of double inverse coordinates) of the rate of reaction catalysed by glutathione reductase on the NADPH concentration in animals of the control group (a) and rats with paracetamol-induced liver disease (b).

степенью очистки 33.3. Частично очищенный ферментный препарат использовали для выяснения каталитических и регуляторных свойств.

Результаты работы показали, что у крыс с ППП Км по отношению к НАДФН, рассчитанная методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка, снижалась относительно значений контрольных животных (рис. 1). Наблюдаемое возрастание сродства ГР к НАДФН, по-видимому, было сопряжено с увеличением активности фермента, происходящим в результате окисления GSH в ходе метаболизма парацетамола. Так, из-

вестно, что парацетамол окисляется в печени цитохромом P450, в результате образуется высокореактивный токсичный электрофильный алкилирующий метаболит N-ацетил-п-бензохинонимин, который инактивируется с помощью конъюгации с GSH [10].

Как известно, в условиях парацетамоловой интоксикации происходит снижение запасов GSH и связанное с этим накопление реактивных молекул, повреждающих жизненно важные клеточные структуры [11]. В связи с этим, было проведено исследование регуляторного воздействия цитрата, изоцитрата и глюкозо-6-фосфата на активность ГР из печени

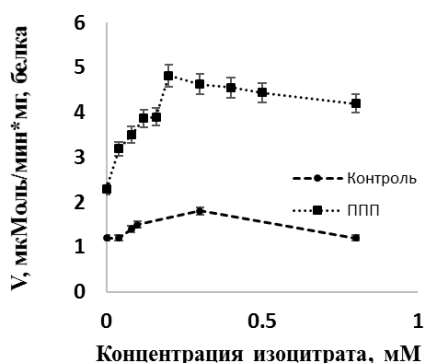


Рис. 2. Влияние изоцитрата на активность глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП).

Fig.2. The effect of isocitrate on the activity of glutathione reductase from the liver of control rats (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

крыс с ППП. Изоцитрат и глюкозо-6-фосфат являются субстратами для НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – основных поставщиков НАДФН для функционирования ГР. В результате проведенных исследований было показано, что изоцитрат способствует более существенной активации ГР из печени крыс с ППП в концентрациях до 0.2 мМ, по сравнению с контрольными показателями. При дальнейшем увеличении концентрации данного соединения, наблюдалось снижение ферментативной активности (рис. 2). Было также показано, что у животных с ППП наблюдалось более значительное возрастание активности ГР при добавлении в реакционную среду глюкозо-6-фосфата (рис. 3). Наблюдаемые изменения регуляторных свойств ГР у крыс с патологией, очевидно, были связаны с дополнительным активирующим действием изоцитрата и глюкозо-6-фосфата на фермент, что могло происходить в условиях окисления GSH в процессе метаболизма парацетамола.

Интерес также представляет анализ воздействия цитрата на активность ГР

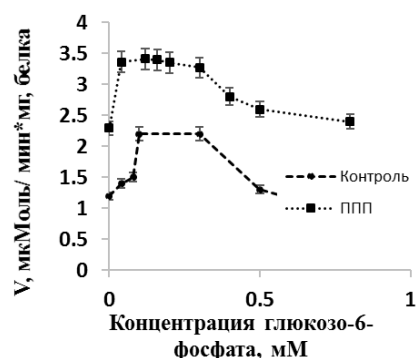


Рис. 3. Влияние глюкозо-6-фосфата на активность глутатионредуктазы крыс контрольной группы (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП).

Fig. 3. The effect of glucose-6-phosphate on the activity of glutathione reductase from the liver of control rats (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

при ППП. Как показали проведенные исследования, добавление в реакционную среду цитрата существенно снижало активность ГР из печени животных с ППП в концентрации до 0,2 мМ, по сравнению с ГР из печени контрольных крыс (рис. 4). Наблюдаемые изменения свойств фермента могут быть обусловлены наличием у цитрата антиоксидантных свойств, способствующих снижению окислительной нагрузки, вызванной введением парацетамола. Так, известно, что цитрат способен хелатировать ионы Fe^{2+} и Ca^{2+} . Свободные ионы Fe^{2+} являются прооксидантами благодаря способности инициировать в реакции Фентона генерацию гидроксильного радикала, который обладает чрезвычайно высокой реакционной способностью [12]. Ионы Ca^{2+} выступают активаторами НАДФН-оксидазы, способной образовывать супероксидный анион-радикал, дающий начало другим более реакционноспособным реактивным молекулам [13]. Ионы Ca^{2+} также увеличивают активность фосфолипаз, расщепляющих компоненты биологических мембран клеток.

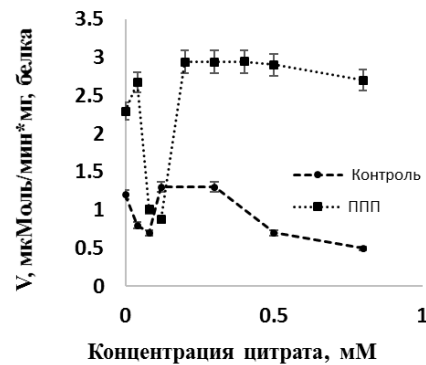


Рис.4. Влияние цитрата на активность глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП).
 Fig. 4. The effect of citrate on the activity of glutathione reductase from the liver of control rats (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

Таким образом, путём фракционирования с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе был получен частично очищенный препарат ГР из печени животных с ППП. Ключевой стадией очистки при этом, позволившей избавиться от значительного количества примесей, была ионообменная хроматография, в результате которой удалось получить достаточно чистый препарат ГР для оценки регуляторных свойств фермента. На основании проведенных исследований было показано, что в условиях ППП происходит увеличение сродства ГР к НАДФН и изменение её регуляции под действием цитрата, изоцитрата и глюкозо-6-фосфата, что, по-видимому, связано с активацией фермента на фоне истощения запасов GSH.

Заключение

В ходе исследований с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе была получена ГР из

Список литературы/References

1. Korenskaya E.G., Paramonova O.V. Medicinal liver damage is one of the important problems in a comorbid patient. *Consilium Medicum*. 2019; 21(8): 78-83. <https://doi.org/10.26442/20751753.2019.8.190355>
2. Kong L.Z., Chandimali N, Han Y.H., Lee D.H., Kim J.S., Kim S.U., Kim T.D., Jeong

печени крыс с ППП со степенью очистки 33.3. Показано, что на фоне развития патологии происходила активация фермента и увеличение сродства ГР к НАДФН. Кроме этого, у ГР из печени крыс с ППП наблюдалось более существенное увеличение активности при добавлении в реакционную среду изоцитрата и глюкозо-6-фосфата – субстратов для ферментов-поставщиков НАДФН. Для ГР из печени крыс с ППП наблюдалось также более значительное снижение активности при добавлении цитрата, что могло быть связано с конформационными перестройками фермента вследствие наличия у данного метаболита антиоксидантных свойств.

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.

- D.K., Sun H.N., Lee D.S., Kwon T. Pathogenesis, Early Diagnosis, and Therapeutic Management of Alcoholic Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(11): 2712-2733. <https://doi.org/10.3390/ijms20112712>
3. Cichoż-Lach H., Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(25): 8082-8091. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>



4. Newsome P.N., Plevris J.N., Nelson L.J., Hayes P.C. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation *Liver Transpl.* 2000; 6: 21-31. <https://doi.org/10.1002/lt.500060110>
5. Polson J., Lee W.M., American Association for the Study of Liver Disease. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology.* 2015; 41(5): 1179-1197. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>
6. Wang Z., Hao W., Hu J. Maltol improves APAP-induced hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress and inflammation response via NF- κ B and PI3K/Akt signal pathways. *Antioxidants.* 2019; 8(9): 395-398. <https://doi.org/10.3390/antiox8090395>
7. Hasanuzzaman M., Bhuyan, M.H.M.B., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J.A., Fujita, M. Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. *Antioxidants.* 2019; 8: 384. <https://doi.org/10.3390/antiox8090384>
8. Mitchel J.R., Jallow D.G., Potter W.Z., Acetaminophen-induced hepatic necrosis. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 187: 211-217. <https://doi.org/10.3390/antiox8090395>
9. Popov S.S., Agarkov A.A., Kryl'skiy E.D., Shul'gin K.K., Popova T.N., Safonova O.A. The activity of glutathione reductase under liver pathologies and enzyme purification by ion-exchange chromatography for the catalytic properties study. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie Protsessy.* 2018; 7(1): 168-175.
10. Jönsson B.A.G., Ermund A., Andersson D.A., Björk H, Alexander J.P. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem.* 2015; 280: 31405-31412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501489200>
11. Graham G.G., Davies M.J., Day R.O., Mohamudally A., Scott K.F. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology.* 2013; 21: 201-232. <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0172-x>
12. Tran R.T., Yang J., Ameer G.A. Citrate-Based Biomaterials and Their Applications in Regenerative Engineering. *Annu Rev Mater Res.* 2015; 45: 277-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070214-020815>
13. Akram M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochem Biophys.* 2014; 68: 475-478. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9750-1>

Информация об авторах / Information about the authors

С.Е. Кравцова – аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Т.Н. Попова – декан медико-биологического факультета, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Е.Д. Крыльский – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Л.В. Матасова – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Ю.И. Лебедева – студент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

S.E. Kravtsova – post-graduate student, department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: vip.sveta.popova@mail.ru

T.N. Popova – Dean of the Faculty of Medicine and Biology, grand Ph.D (biology), department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: biomed-popova@yandex.ru

E.D. Kryl'skii – docent, department of medical biochemistry and microbiology, Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: evgenij.krylsky@yandex.ru

L.V. Matasova – docent, department of medical biochemistry and microbiology, Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: larissamatasova@yandex.ru

Yu.I. Lebedeva – student, department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: dorokhova.io@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 20.09.2022; одобрена после рецензирования 16.12.2022; принята к публикации 21.12.2022.

The article was submitted 20.09.2022; approved after reviewing 16.12.2022; accepted for publication 21.12.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 631.4

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10894

Формирование горизонта плужной подошвы в черноземах и ее сорбционные особенности в отношении органического вещества и тяжелых металлов

Аркадий Игоревич Громовик¹✉, Надежда Сергеевна Горбунова¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, agrom.ps@mail.ru[✉]

Аннотация. Горизонт плужной подошвы, формируемый при распашке черноземов, отличается значительным уплотнением почвенной массы, а также аккумуляцией тонких элементарных почвенных частиц (ЭПЧ). Это в свою очередь, ограничивает глубину проникновения корневых систем культурных растений, и как следствие, ведет к снижению их продуктивности. На наш взгляд, формирование горизонта плужной подошвы дает предпосылки для увеличения его сорбционной способности в отношении органического вещества и тяжелых металлов. Согласно этой гипотезе, горизонт плужной подошвы можно рассматривать как геохимический барьер для дальнейшей вертикальной миграции органического вещества и солей тяжелых металлов в почвах. Цель работы: установить механизмы формирования горизонта плужной подошвы в черноземах и исследовать его сорбционные свойства в отношении органического вещества и тяжелых металлов – свинца и кадмия.

Задачи исследования являлось проведение полевых исследований морфогенетических особенностей черноземов, подверженных формированию плужной подошвы; отобрать почвенные образцы провести в них ряд лабораторных исследований по выявлению сорбционных свойств в отношении органического вещества и тяжелых металлов (Pb и Cd); доказать, что формируемый агрогенным путем горизонт плужной подошвы является геохимическим барьером для дальнейшей вертикальной миграции органического вещества и тяжелых металлов.

Установлено, что горизонт плужной подошвы формируется при пахотно-иллювиальной аккумуляции тонкодисперсных ЭПЧ, которые проявляют существенные сорбционные свойства в отношении углерода органических соединений почвы, лабильных гумусовых веществ и подвижных форм тяжелых металлов (Pb и Cd). Горизонт выступает в качестве барьера дальнейшей активной миграции мобильной фракции органического вещества и подвижных солей ТМ. Формирование плужной подошвы следует рассматривать как признак деградации черноземов, так как комплекс неблагоприятных свойств (увеличение плотности почв и сужение порового пространства на 10% по сравнению с вышележащим пахотным горизонтом) способствуют снижению продуктивности растений. Аккумуляция тяжелых металлов, обусловленная плужной подошвой, может способствовать их более активной транслокации в растительные организмы, ухудшая качество растениеводческой продукции. В связи с этим комплекс агро-технических мероприятий должен быть направлен на борьбу с этим негативным явлением.

Ключевые слова: сорбционная способность, элементарные почвенные частицы, органическое вещество почв, тяжелые металлы, плужная подошва.

Для цитирования: Громовик А.И., Горбунова Н.С. Формирование горизонта плужной подошвы в черноземах и ее сорбционные особенности в отношении органического вещества и тяжелых металлов // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 877-884.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10894>

Original article

Formation of the tillage pan bottom horizon in black soils and its sorption features with respect to organic matter and heavy metals

Arkady I. Gromovik¹✉, Nadezhda S. Gorbunova¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, agrom.ps@mail.ru[✉]



Abstract. The tillage pan horizon, which forms when black soils are ploughed, is characterised by a significant compaction of soil material and accumulation of fine elementary soil particles (ESP). This, in turn, limits the penetration depth of root systems of cultivated plants, and, as a result, leads to a decreased productivity. In our opinion, the formation of the tillage pan horizon provides the prerequisites for its increased sorption capacity with respect to organic matter and heavy metals. According to this hypothesis, the tillage pan horizon can be considered as a geochemical barrier for further vertical migration of organic matter and heavy metal salts in soils. Objectives: to establish mechanisms of the formation of the tillage pan horizon in black soils and to study its sorption properties with respect to organic matter and heavy metals, i.e. lead and cadmium.

The research involved completing the following tasks: to conduct a field study of the morphogenetic features of black soils susceptible to the formation of tillage pans; to select soil samples and to conduct a number of laboratory studies aimed at identifying their sorption properties with regard to organic matter and heavy metals (Pb and Cd); to prove that the tillage pan horizon, which has been formed in an agrogenic way, is a geochemical barrier for further vertical migration of organic matter and heavy metals.

It was established that the tillage pan horizon is formed during the arable and illuvial accumulation of fine ESPs, which exhibit sorption properties with respect to carbon of organic compounds in the soil, labile humus substances, and mobile forms of heavy metals (Pb and Cd). The horizon acts as a barrier for further active migration of the mobile fraction of organic matter and mobile heavy metal salts. The formation of tillage pans should be considered as a sign of black soil degradation since a combination of unfavourable properties (an increase in soil density and a 10% reduction in pore space as compared to the upper arable horizon) contributes to decreased plant productivity. Heavy metals accumulated due to tillage pans can contribute to their more active translocation into plant organisms and therefore degrade crop output. In this regard, a set of agrotechnical measures should be implemented to mitigate this negative phenomenon.

Keywords: sorption capacity, elementary soil particles, soil organic matter, heavy metals, tillage pan.

For citation: Gromovik A.I., Gorbunova N.S. Formation of the tillage pan bottom horizon in black soils and its sorption features with respect to organic matter and heavy metals. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 877-884. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10894>

Введение

Одним из главных факторов агрогенной трансформации черноземов является их распашка. Многие исследователи отмечают возможность антропогенной эволюции верхней части гумусовой толщи путем формирования под пахотным горизонтом уплотненного горизонта плужной подошвы [1-3]. Горизонт плужной подошвы отличается значительным уплотнением почвенной массы, а также аккумуляцией тонких элементарных почвенных частиц (ЭПЧ) на поверхности которых могут сорбироваться органическое вещество и тяжелые металлы [4]. Это в свою очередь, ограничивает глубину проникновения корневых систем культурных растений, и как следствие, ведет к снижению их продуктивности [5]. На наш взгляд, формирование горизонта плужной подошвы дает предпосылки для увеличения его сорбционной способности в отношении органического вещества и тяжелых металлов. Согласно этой гипотезе, формируемый агрогенным путем гори-

зонт плужной подошвы можно рассматривать как геохимический барьер для дальнейшей вертикальной миграции органического вещества и солей тяжелых металлов в почвах.

Цель работы – установить механизмы формирования горизонта плужной подошвы в черноземах и исследовать его сорбционные свойства в отношении органического вещества и тяжелых металлов – свинца и кадмия.

Задачи: провести полевые исследования морфогенетических особенностей черноземов, подверженных формированию плужной подошвы; отобрать почвенные образцы провести в них ряд лабораторных исследований по выявлению сорбционных свойств в отношении органического вещества и тяжелых металлов (Pb и Cd); доказать, что формируемый агрогенным путем горизонт плужной подошвы является геохимическим барьером для дальнейшей вертикальной миграции органического вещества и тяжелых металлов.



Экспериментальная часть

Полевые исследования проводились на территории землепользования ОАО «Восход» (Хохольский район, Воронежской области). В качестве объектов исследований выступали старопахотные черноземы типичные малогумусные среднесиловые тяжелосуглинистые на покровных карбонатных суглинках. Почвенные образцы отбирались сплошной колонкой каждые 5 см до глубины 50 см в 8-кратной повторности.

Аналитические исследования проводились в лабораториях кафедры экологии и земельных ресурсов Воронежского государственного университета. В отобранных почвенных образцах определялись следующие показатели по соответствующим методикам: гранулометрический состав методом пипетки по Н.А. Качинскому с обработкой почвы пирофосфатом натрия; микроагрегатный состав методом пипетирования по Н.А. Качинскому; структурный анализ почвы по методу Н.И. Саввинова (сухое и мокрое просеивание); плотность сложения почвы методом режущего кольца; плотность твердой фазы почвы пикнометрическим методом; углерод органических соединений почвы ($S_{орг.}$) методом И.В. Тюрина в модификации В.Н. Симакова; углерод лабильных гумусовых веществ ($S_{лгв}$) в пирофосфатной вытяжке; подвижные формы соединений ТМ – Pb и Cd в вытяжке ацетатно-аммонийного буфера атомно-абсорбционным методом на спектрометре КВАНТ – Z. ЭТА. Расчетными методами определяли общую пористость почвы и коэффициент структурности почвы ($K_{стр.}$).

Модельные эксперименты были проведены на почвенных образцах различного гранулометрического состава, в которых определяли зависимости содержания в почве $S_{орг.}$, $S_{лгв}$ и ТМ от содержания физической глины (ЭПЧ размером <0.01 мм).

Результаты аналитических исследований обрабатывались статистически с использованием программ Statistika 6.0 и Microsoft Excel 2010.

Обсуждение результатов

Полевые исследования позволили выделить основные морфогенетические особенности горизонта плужной подошвы в старопахотных черноземах. Среди них можно отметить следующее: существенная уплотненность почвенной массы; слабовыраженная микропористость; наличие крупных, прочных островершинных структурных отдельностей; органоминеральные коллоидные кутаны на поверхности структурных отдельностей.

Объекты исследований в верхней части почвенного профиля имеют тяжело-суглинистый гранулометрический состав (содержание ЭПЧ <0.01 мм составляет 49.4-54.6%), который с глубиной постепенно утяжеляется до среднеглинистого (доля ЭПЧ <0.01 мм достигает до 66.8%). Среди фракций преобладает крупнопылевая (ЭПЧ 0.05-0.01 мм) – 31.8-37.2% (табл. 1).

Распределение фракций физической глины и ила (<0.001 мм) с глубиной почвы не равномерное. Под пахотной толщей в горизонте формирования плужной подошвы (на глубине 20-25 см) количество этих фракций аккумулируется, что подтверждается наличием максимумов на кривых профильного распределения (рис. 1).

Важным диагностическим критерием формирования горизонта плужной подошвы выступает уплотнение в нем почвы и сужение порового пространства. По сравнению с пахотной толщей, горизонт плужной подошвы уплотняется на 0.18 г/см³. Это способствует уменьшению пористости почвенной массы на 10%. Так на рис. 1-2 можно наблюдать характерный максимум уплотнения и сужение порового пространства (минимум) в горизонте формирования плужной подошвы (20-25 см).

Благодаря заметному уплотнению почвенной массы и накоплению тонких ЭПЧ в

Таблица 1. Гранулометрический состав старопашотных черноземов ОАО «Восход», n=8
 Table 1. Granulometric composition of the old-arable black soils belonging to ОАО Voskhod, n=8

Глубина, см	Содержание фракций ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), % (размер частиц, мм)						
	1-0.25	0.25-0.05	0.05-0.01	0.01-0.005	0.005-0.001	<0.001	<0.01
0-5	9.8±0.4	5.8±0.2	35.0±1.3	9.5±0.4	18.6±0.9	21.3±1.1	49.4±1.8
5-10	9.8±0.3	2.0±0.1	37.2±1.5	9.4±0.5	19.9±0.9	21.7±1.0	51.0±2.0
10-15	4.8±0.1	9.4±0.3	31.2±1.2	10.8±0.4	30.3±1.2	13.5±0.6	54.6±2.1
15-20	4.1±0.2	9.9±0.3	31.8±1.2	12.2±0.5	16.0±0.7	26.0±1.0	54.2±2.4
20-25	4.2±0.2	11.1±0.4	30.6±1.3	6.0±0.3	20.3±1.1	27.8±1.0	54.1±2.1
25-30	4.1±0.1	11.0±0.3	22.9±1.0	11.2±0.4	15.1±0.6	35.7±1.3	62.0±2.6
30-35	3.5±0.1	10.8±0.4	23.9±1.1	9.6±0.3	23.4±1.1	28.8±1.0	61.8±2.6
35-40	3.3±0.1	9.6±0.3	20.3±1.0	10.1±0.4	29.3±1.0	27.4±1.1	66.8±2.5
40-45	3.3±0.2	9.8±0.3	20.0±0.9	11.0±0.4	27.5±1.0	28.4±1.0	66.9±2.8
45-50	3.4±0.2	9.4±0.3	22.3±1.1	9.8±0.3	25.1±1.1	30.0±1.2	64.9±2.5

*n – количество образцов; \bar{x} – среднее арифметическое; $s_{\bar{x}}$ – ошибка среднего арифметического.

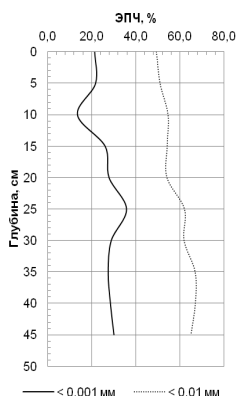


Рис. 1. Профильное распределение физической глины и ила в старопашотных черноземах ОАО «Восход» (n=8)
 Fig. 1. Depthwise distribution of physical clay and silt in the old-arable black soils belonging to ОАО Voskhod (n=8)

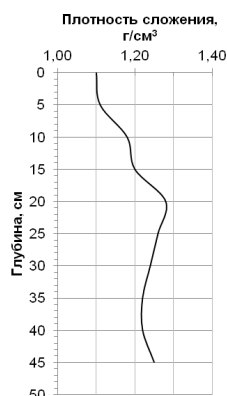


Рис. 2. Профильное распределение плотности сложения в старопашотных черноземах ОАО «Восход» (n=8)
 Fig. 2. Depthwise distribution of bulk density in the old-arable black soils belonging to ОАО Voskhod (n=8)

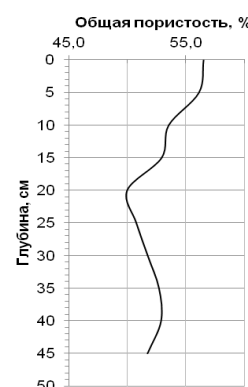


Рис. 3. Профильное распределение общей пористости в старопашотных черноземах ОАО «Восход» (n=8)
 Fig. 3. Depthwise distribution of total porosity in the old-arable black soils belonging to ОАО Voskhod (n=8)

горизонте формирования плужной подошвы происходит аккумуляция $S_{орг}$ (до 3.65%) и $S_{лгв}$ (до 0.36%). На графиках профильного распределения $S_{орг}$ и $S_{лгв}$ в старопашотных черноземах обнаруживается второй максимум аккумуляции в горизонте плужной подошвы на глубине 20-25 см (рис. 4-5), ниже которого содержание рассматриваемых показателей постепенно убывает с глубиной. При этом аккумуляция $S_{лгв}$ в плужной подошве выражена бо-

лее отчетливо, что хорошо иллюстрируется графиком профильного распределения $S_{лгв}$ (рис. 6).

Из полученных данных видно, что сорбция $S_{орг}$ и $S_{лгв}$ в горизонте плужной подошвы происходит за счет увеличения в нем доли ЭПЧ <math><0.01\text{ мм}</math>. Многие исследования показывают, органическое вещество почв напрямую зависит от содержания глинистых ЭПЧ, которые в свою очередь соединяются между собой силами

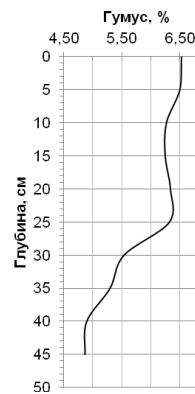


Рис. 4. Профильное распределение гумус в черноземах типичных (n=8)
Fig. 4. Depthwise distribution of humus in typical black soils (n=8)

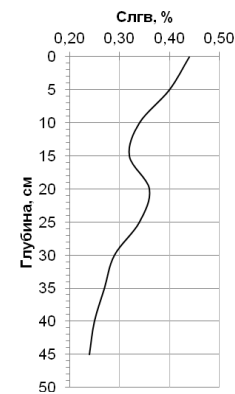


Рис. 5. Профильное распределение С_{ЛГВ} в черноземах типичных (n=8)
Fig. 5. Depthwise distribution of C_{LHS} in typical black soils (n=8)

гидрофобного связывания за счет амфифильности [6-8].

В тонкодисперсных фракциях количество закрепленного органического вещества и алкильного углерода возрастает [9]. Главная роль в повышении $C_{орг}$ почв принадлежит ЭПЧ размером <0.01 мм, что отмечают в своих работах многие ученые [10-17].

Поведение тяжелых металлов, согласно многочисленным исследованиям, в том числе и нашим, определяется как профильным распределением органического вещества, так и илистой фракцией [18-19]. Так при взаимодействии Pb и Cd с молекулами гуминовых кислот образуются прочные соединения хелатного типа, при этом Cd имеет меньшее сродство к гуминовым кислотам [20]. Данное положение подтверждается коэффициентами корреляции между профильным распределением органического вещества, Pb и Cd, которые равны 0.92 и 0.89 (при $P=95.0\%$).

Для подтверждения вышесказанного нами была проделана серия модельных лабораторных экспериментов (объем выборки $n=25$). В почвенных образцах с разной обогащенностью ЭПЧ <0.01 мм определяли содержание $C_{орг}$ и $C_{ЛГВ}$, а также подвижные соединения Pb и Cd. В ходе анализа были выявлены тесные корреляционные зависимости всех показателей осо-

бенно по $C_{ЛГВ}$ ($R^2=0.94$ при $P=95.0\%$) с физической глиной (рис. 6 и 7). Высокие корреляционные зависимости отмечаются в профильном распределении физической глины и тяжелыми металлами (рис. 8 и 9). Данный эксперимент подтверждает высокую сорбционную способность ЭПЧ, размером <0.01 мм к Pb и Cd. На рисунках 6-9 прослеживаются некоторые отличия между прямолинейной зависимостью сорбции рассматриваемых показателей и экспериментальными точками с ростом доли ЭПЧ <0.01 мм. Это обусловлено дополнительным воздействием химически связанной влаги в минеральной фракции почв, а также естественным варьированием показателей [10, 21].

Полученные зависимости позволяют сделать вывод, что по мере увеличения в гранулометрическом составе доли тонких ЭПЧ, увеличивается сорбционная способность почвы в отношении органического вещества (в нашем случае $C_{орг}$ и $C_{ЛГВ}$), а также подвижных соединений Pb и Cd. Таким образом, аккумуляция физической глины в горизонте формирования плужной подошвы способствует также аккумуляции в ней органического вещества и тяжелых металлов. Кроме того, данный горизонт служит не только барьером для дальнейшей активной миграции мобильной фракции органического вещества

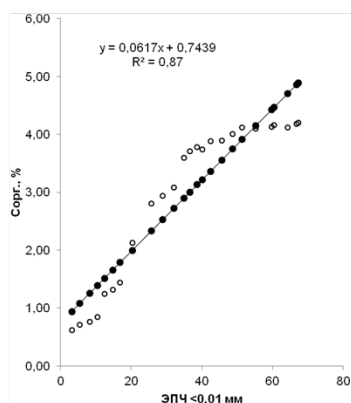


Рис. 6. Зависимость сорбции $C_{орг}$ от содержания в почве ЭПЧ <0.01 мм
 Fig. 6. Dependence of $C_{орг}$ Sorption on the content of ESP in the soil <0.01 mm

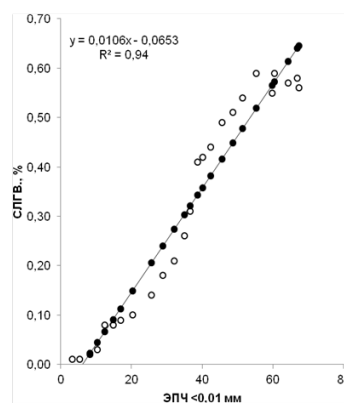


Рис. 7. Зависимость сорбции $C_{ЛГВ}$ от содержания в почве ЭПЧ <0.01 мм
 Fig. 7. Dependence of $C_{ЛГВ}$ sorption on the content of ESP in the soil <0.01 mm

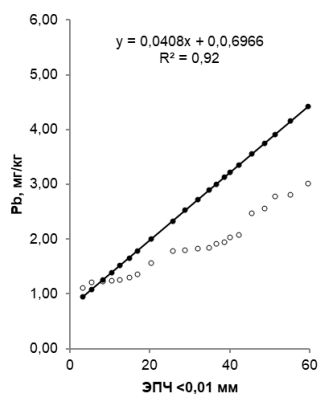


Рис. 8. Зависимость сорбции Pb от содержания в почве ЭПЧ <0.01 мм
 Fig. 8. Dependence of Pb sorption on the content of ESP in the soil <0.01 mm

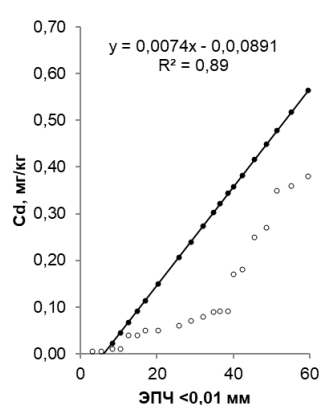


Рис. 9. Зависимость сорбции Cd от содержания в почве ЭПЧ <0.01 мм
 Fig. 9. Dependence of Cd sorption on the content of ESP in the soil <0.01 mm

($C_{ЛГВ}$) вниз по почвенному профилю, но и подвижных соединений Pb и Cd.

Заключение

Установлено, что горизонт плужной подошвы формируется при пахотно-иллювиальной аккумуляции тонкодисперсных элементарных почвенных частиц (ЭПЧ <0.01 мм) с последующим уплотнением, которые проявляют существенные сорбционные свойства в отношении углерода органических соединений почвы, лабильных гумусовых веществ и подвижных форм тяжелых металлов (Pb и Cd). Это также было подтверждено серией модельных экспериментов, в результате которых установлены тесные корреляционные зависимости содержания $C_{орг}$, $C_{ЛГВ}$ и ТМ в

почвах от ЭПЧ <0.01 мм. Горизонт формирования плужной подошвы выступает в качестве барьера дальнейшей активной миграции мобильной фракции органического вещества ($C_{ЛГВ}$) и подвижных солей ТМ.

Горизонт плужной подошвы можно рассматривать как признак деградации верхней части профиля пахотных черноземов, так как высокая плотность и комплекс других неблагоприятных свойств горизонта способствуют снижению продуктивности возделываемых растений. Кроме того, аккумуляция тяжелых металлов в верхней части профиля, обусловленная плужной подошвой, может способствовать их более активной транслокации в растительные ор-



ганизмы, что ухудшает качество растениеводческой продукции. В связи с этим комплекс агротехнических мероприятий должен быть направлен на борьбу с этим негативным явлением.

Список литературы

1. Medvedev V.V. Fizicheskie svoystva i karakter zaleganiya pluzhnoj podshvy v raznyh tipah pahotnyh pochv. *Pochvovedenie*. 2011; 12: 1487-1495. (In Russ.)
2. Azarov V.M., Belokurenko S.A. O pluzhnoj «podshve». *Agrarnaya nauka – sel'skomu hozyajstvu*. 2017; 7-9. (In Russ.)
3. Alenov Zh.N., Koshen B.M., Kabdirova B.S. Metody bor'by s pluzhnoj podshvoj v usloviyah sovremennoj sistemy obrabotki pochvy. *Modern Science*. 2019; 3: 12-15. (In Russ.)
4. Zheng H., Liu W., Zheng J., Luo Y., Li R., Wang H., Qi H. Effect of long-term tillage on soil aggregates and aggregate-associated carbon in black soil of Northeast China. *PLoS ONE*. 2018; 13(6): e0199523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199523>
5. Dexter A.R. Model experiments on the behavior of roots at the interface between a tilled seedbed and a compacted subsoil. 2. Entry of pea and wheat roots into subsoil. *Plant and Soil*. 1986; 95: 135-147.
6. Dymov A.A., Milanovskii E.Y. Assessing the complexing properties of soil organic matter by IMAC (case study of copper ions). *Eurasian Soil Science*. 2020; 53. 2: 178-186. <https://doi.org/10.1134/S1064229320020040>
7. Jastrow J.D., Miller R.M., Boutton T.W. Carbon dynamics of aggregate-associated organic matter estimated by carbon-13 natural abundance. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1996; 60: 801-807.
8. John B., Yamashita T., Ludwig B., Flessa H. Storage of organic carbon in aggregate and density fractions of silty soils

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.

under different types of land use. *Geoderma*. 2005; 128: 63-79.

9. Schulten H.R., Leinweber P. New insights into organic–mineral particles: composition, properties and models of molecular structure. *Biology Fertility Soils*. 2000; 30: 399-432.

<https://doi.org/10.1007/s003740050020>

10. Arthur E., de Jonge L.W., Tuller M., Moldrup P. Clay content and mineralogy, organic carbon and cation exchange capacity affect water vapour sorption hysteresis of soil. *European Journal of Soil Science*. 2020; 71(2): 204-214.

<https://doi.org/10.1111/ejss.12853>

11. Olayemi O.P., Wallenstein M.D., Kallenbach C.M. Distribution of soil organic matter fractions are altered with soil priming. *Soil Biology and Biochemistry*. 2022; 164: 108494. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108494>

12. Piccolo A., Mbagwu J.S.C. Effects of different organic waste amendments of soil microaggregates stability and molecule sizes of humic substances. *Plant Soil*. 1990; 123: 27-37.

13. Startsev V.V., Khaydapova D.D., Degteva S.V., Dymov A.A. Soils on the southern border of the cryolithozone of European part of Russia (the Subpolar Urals) and their soil organic matter fractions and rheological behavior. *Geoderma*. 2020; 361. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114006>

14. Blair G.J., Lefroy R.D.B., Singh B.P. Development and use of a carbon management index to monitor changes in soil C pool size and turnover rate. *Driven by nature: Plant litter quality and decomposition*. 1997; 273-282.



15. Tarchitzky J., Hatcher P.G., Chen J. Properties and distribution of humic substances and inorganic structurestabilizing components in particle-size fractions of cultivated Mediterranean soils. *Soil Sci.* 2000; 165: 328-342.

16. Laird D.A., Martens D.A., Kingery W.L. Nature of clayhumic complexes in an agricultural soil: chemical, biochemical and spectroscopic analysis. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 2001; 65: 1413-1418.

17. Chefetz B., Tarchitzey J., Deshmukh A.P. Structural characterization of humic acids in particle-size fraction an agricultural soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2002; 66: 129-141.

18. Rajput V.D., Minkina T.M., Kumari A., Shende S.S., Ranjan A., Barakhov A.V., Rajput P., Sushkova S.N., Faizan M., Singh A., Khabirov I., Gromovik A., Gorbunova N., Nazarenko O., Kizilkaya R. A review on nanobioremediation approaches

for restoration of contaminated soil. *Eurasian Journal of Soil Science.* 2022; 11: 43-60. <https://doi.org/10.18393/EJSS.990605>

19. Yakovets L. Migration of heavy metals in the soil profile. *Norwegian Journal of Development of the International Science.* 2021; 54-1: 8-12. <https://doi.org/10.24412/3453-9875-2021-54-1-8-12>

20. Sabitova A.N., Bayakhmetova B.B., Mussabayeva B.Kh., Orazhanova L.K., Ganiyeva K.G. Sorption of heavy metals by humic acids of chestnut soils. *Bulletin of the Karaganda University. Chemistry Series.* 2020; 3 (99): 88-98. <https://doi.org/10.31489/2020Ch3/88-98>

21. Zhang Y., Zhen Q., Xin J., Yuan Y., Wu Z., Zhang X., Cui Y., Li P. Storage of soil organic carbon and its spatial variability in an agro-pastoral ecotone of Northern China. *Sustainability.* 2020; 12. 6: 2259. . <https://doi.org/10.3390/su12062259>

Информация об авторах / Information about the authors

А.И. Громовик – к.б.н., доцент кафедры экологии и земельных ресурсов Воронежского государственного университета, Воронеж, Россия

Н.С. Горбунова – к.б.н., доцент кафедры экологии и земельных ресурсов Воронежского государственного университета, Воронеж, Россия

A.I. Gromovik – PhD, associate professor, Department of ecology and land resources, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, agrom.ps@mail.ru

N.S. Gorbunova – PhD, associate professor, Department of ecology and land resources, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, vilian@list.ru

Статья поступила в редакцию 29.09.2022; одобрена после рецензирования 28.11.2022; принята к публикации 07.12.2022.

The article was submitted 29.09.2022; approved after reviewing 28.11.2022; accepted for publication 07.12.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10895

Модификация методики выделения микроРНК из растений фенол-хлороформной экстракцией с применением полиэтиленгликоля 1500

Дмитрий Николаевич Федорин¹, Виктория Олеговна Чуйкова¹, Александр Трофимович Епринцев¹✉

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru✉

Аннотация. МикроРНК – класс малых некодирующих РНК, имеющих длину от 18 до 25 нуклеотидов и встречающихся в большинстве эукариотических организмов. Важное значение микроРНК могут играть в эпигенетических механизмах регуляции генома, включая метилирование ДНК, модификацию РНК и гистонов. Современные методы обнаружения и количественного определения микроРНК в значительной степени основаны на клонировании, нозерн-блоттинге или удлинении праймера, но каждый из них требует наличия чистого препарата анализируемого типа РНК. Стандартный метод выделения РНК, основанный на фенол-хлороформной экстракции со специфическими соосадителями нуклеиновых кислот, позволяет получать препараты суммарной клеточной РНК с преобладанием высокомолекулярных типов рибонуклеиновых кислот. Это в значительной степени затрудняет проведение идентификации и количественной оценки микроРНК в препаратах образцов. Модификация метода фенол-хлороформной экстракции РНК, основанном на ее преципитации ДНК со специфическим осадителем, таким как хлорид лития, показала, что применение полиэтиленгликоля 1500 с использованием в качестве осадителя 2.5 М LiCl в присутствии 96% этанола обеспечивает высокий выход и качественную экстракцию микроРНК, которую можно использовать для дальнейших аналитических исследований. Проведение ПЦР для оценки качества выделенной микроРНК со специфическими праймерами к miR165a показало наличие одного продукта амплификации размером около 80 п.н., что соответствует теоретическим значениям, рассчитанным на основе разработанного зонда для данной микроРНК. Положительный результат ПЦР свидетельствует о наличии в используемой матрице анализируемой микроРНК. Следовательно, применение модифицированной методики выделения РНК с использованием полиэтиленгликоля 1500 (ПЭГ 1500) в качестве элемента разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных нуклеиновых кислот позволило получить препараты микроРНК, которые можно применять для дальнейших аналитических исследований.

Ключевые слова: *Zea mays*, микроРНК, полиэтиленгликоль, полимеразная цепная реакция, ампликон.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

Для цитирования: Федорин Д.Н., Чуйкова В.О., Епринцев А.Т. Модификация методики выделения микроРНК из растений фенол-хлороформной экстракцией с применением полиэтиленгликоля 1500 // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 885-892.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10895>

Original article

Modification of the method for isolating miRNAs from plants phenol-chloroform extraction using polyethylene glycol 1500

Dmitry N. Fedorin¹, Victoria O. Chuykova¹, Alexander T. Eprintsev¹✉

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru✉

Abstract. MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs ranging in length from 18 to 25 nucleotides and found in most eukaryotic organisms. MicroRNAs can play an important role in epigenetic mechanisms of genome regulation, including DNA methylation, RNA and histone modification. Current methods for the detection and quantification of microRNAs are largely based on cloning, northern blotting, or primer extension, but each requires a pure preparation of the RNA type being analyzed. The standard RNA isolation method based on phenol-chloroform extraction with specific nucleic acid co-precipitants makes it possible to obtain preparations of total cellular RNA with a predominance of high-molecular types of ribonucleic acids. This greatly complicates the identification and quantification of miRNAs in sample preparations. Modification of the method of phenol-chloroform extraction of RNA, based on its precipitation of DNA with a specific precipitant, such as lithium chloride, showed that the use of polyethylene glycol 1500 with 2.5 M LiCl as a precipitant in the presence of 96% ethanol provides a high yield and high-quality microRNA extraction, which can be used for further analytical studies. PCR to assess the quality of the isolated microRNA with specific primers for miR165a showed the presence of one amplification product about 80 bp, which corresponds to the theoretical values calculated on the basis of the developed probe for this microRNA. A positive PCR result indicates the presence of the analyzed miRNA in the matrix used. Therefore, the use of a modified RNA isolation technique using polyethylene glycol 1500 (PEG 1500) as an element for the separation of high and low molecular weight nucleic acids made it possible to obtain miRNA preparations that can be used for further analytical studies.

Keywords: *Zea mays*, miRNA, polyethylene glycol, polymerase chain reaction, amplicon.

Acknowledgments: the study received financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of State Contract with universities regarding scientific research in 2020-2022, project no. FZGU-2020-0044.

For citation: Fedorin D.N., Chuykova V.O., Eprintsev A.T. Modification of the method for isolating miRNAs from plants phenol-chloroform extraction using polyethylene glycol 1500. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 885-892. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10895>

Введение

Последнее десятилетие сопровождается появлением большого количества исследований, посвященных роли малых, не кодирующих белок молекул РНК (микроРНК). Выявлена ключевая роль микроРНК в связывании с 3'-нетранслируемым концом мРНК и последующем индуцировании деградации мРНК или ингибировании трансляции мРНК. МикроРНК, как эпигенетические модуляторы, влияют на уровни белка целевых мРНК без модификации последовательностей генов. Кроме того, микроРНК также могут регулироваться эпигенетическими модификациями, включая метилирование ДНК, модификацию РНК и гистонов [1].

Взаимные действия микроРНК и эпигенетического пути, по-видимому, образуют петлю микроРНК-эпигенетической обратной связи и оказывают обширное влияние на изменение экспрессии генов. Нарушение регуляции петли микроРНК-эпигенетической обратной связи мешает физиологическим и патологическим процессам и способствует возникновению

различных нарушений. В дополнение к тому, что микроРНК сами регулируются эпигенетическим механизмом [2], они также могут влиять на экспрессию компонентов данного процесса, нацеливаясь на ферменты, участвующие в контроле различных эпигенетических процессов. Связанные с изменением метильного статуса ферменты, такие как DNMTs, TETs, HDAC и EZH могут регулироваться микроРНК через эпигенетические механизмы и называются эпи-микроРНК. Экспрессия этих микроРНК имеет важное значение для эпигенетической регуляции большого количества путей клеточного метаболизма и различных процессов [3].

С момента открытия miRNAs большие успехи в характеристике этих семейств генов определили механизм их функций в регуляции генов [4]. Современные методы обнаружения и количественного определения miRNAs в значительной степени основаны на клонировании, нозерн-блоттинге [5] или удлинении праймера [6]. Хотя микрочипы могут повысить производительность профилирования микроРНК, метод относительного

тельно ограничен с точки зрения чувствительности и специфичности [7, 8]. ПЦР в реальном времени является «золотым» стандартом для количественной оценки экспрессии генов [9-11]. Важным при использовании метода ПЦР в реальном времени для количественной оценки микроРНК является ее экстракция из клетки. Неэффективное выделение микроРНК может повлиять на последующий анализ и даже привести к спорным полученным результатам.

В связи с этим, целью работой являлось модифицировать методику выделения РНК из растений с помощью фенол-хлороформной экстракции для получения препаратов микроРНК.

Экспериментальная часть

В качестве объекта для исследования были использованы листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.), которая была выращена гидропонным способом при дневном 12 часовом свете. Белый свет получали от ламп дневного света в установке «Флора-1». Красный и дальний красный свет получали с помощью светодиодов с областью испускания 640-680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) и 710-750 нм (3Л127А-5, Россия). Интенсивность света

составляла 4 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$. Данная интенсивность света достаточна для возникновения сигнальных реакций, связанных с участием фитохромной системы, но не приводит к интенсификации протекания фотосинтеза. Опыты по изучению влияния света различной длины волны на растения проводили по схеме, представленной на рисунке 1.

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl [12]. Качественный анализ РНК проводили путем электрофоретического исследования в геле 1% агарозы. Красителем выступал бромистый этидий.

Для получения кДНК анализируемой микроРНК проводили обратную транскрипцию со специфическим разработанным зондом для miR165a. Параметры проведения обратной транскрипцию следующие: инкубация смеси при 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 85°C – 5 мин [13].

Полимеразную цепную реакцию с генспецифическими праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Нуклеотидный состав праймеров *mir*: прямой – 5' cactgatcggac-caggctca 3'; обратный – 5' gtcgatccagtg-cagggtcc 3'. Параметры амплификации

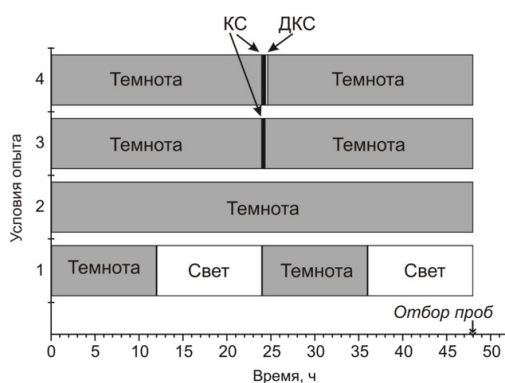


Рис. 1. Схема постановки эксперимента по созданию светового режима.

1 – контрольные растения, выращенные по вышеуказанной методике; 2 – растения, инкубируемые в темноте, далее обозначаются как «темнота»; 3 – растения, облученные красным светом с длиной волны 660 нм, далее обозначаются как «КС»; 4 – растения, облученные дальним красным светом с длиной волны 730 нм, далее обозначаются как «ДКС»; 5 – растения, облученные последовательно красным и дальним красным светом с длинами волн 660 и 730 нм, далее обозначаются как «КС+ДКС».

Fig. 1. Scheme of setting up an experiment to create a light mode.

были следующие: предварительная денатурация – 95°C 5 минут, цикл – 95°C – 30 сек., 58°C – 30 сек., 72°C – 30 сек., финальная элонгация – 72°C – 10 минут.

Денситометрические исследования проводили на электрофореграммах РНК в 1% агарозном геле, с применением программного обеспечения Gel Analyzer 19.1.

Опыты проводились в 3-х кратной биологической и 4-х кратной аналитической повторности. В таблицах и на рисунках представлены данные опытов, в которых каждое значение это среднее арифметическое, посчитанное по результатам трех повторностей. Для получения достоверных данных использовались методы статистической обработки. Результаты являются достоверными, если различия между ними не больше $p \leq 0.05$ [14].

Обсуждение результатов

Применение фенол-хлороформной экстракции суммарной РНК из клеток растений с последующей дополнительной стадией специфического отделения микроРНК позволило получить ее препарат для использования при проведении качественной ПЦР.

На первом этапе выделения суммарной РНК клетки применяли фенол-хлороформную экстракцию со специфическим соосадителем 12 М LiCl в присутствии 96% этанола. Препараты всех видов РНК, в том числе микроРНК, полученных на этом этапе, анализировали электрофоретическим способом в 1%-ном агарозном геле.

Применение фенол-хлороформной экстракции позволило выделить общую РНК клетки практически без следов деградации (рис. 2А). Об этом свидетельствует наблюдаемое на геле преобладание количества 28S рРНК над 18S рРНК, что является одним из важных критериев качества препарата РНК. Кроме того, результаты денситограммы указывают на присутствие в изучаемых препаратах низкомолекулярных нуклеиновых кислот, к которым относится и микроРНК (рис.

2Б). Следовательно, метод фенол-хлороформной экстракции позволяет с высокой эффективностью экстрагировать из растительной клетки все виды РНК, как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные.

Для преципитации низкомолекулярных РНК из суммарной фракции, нами был применен в качестве специфического соосаителя ПЭГ 1500. Эффективность выделения микроРНК из суммарной фракции повышалась при использовании 2.5 М LiCl и этилового спирта. Применение LiCl при осаждении микроРНК позволило дополнительную провести очистку, поскольку хлорид лития не осаждает ДНК и белок. Применение электрофореза в 1%-ом агарозном геле для оценки качества выделенной микроРНК позволило установить эффективность используемой схемы, поскольку на электрофореграмме не обнаружено высокомолекулярных РНК, прежде всего 18S и 28S рРНК (рис. 3А). Также показано с применением анализа гелевой пластинки денситометрическим методом наличие низкомолекулярных нуклеиновых кислот, что указывает на эффективность применяемого в нашем исследовании подхода (рис. 3Б).

Сочетание в качестве осадителей таких веществ как ПЭГ 1500, 2.5 М LiCl и 96% этилового спирта позволило провести отделение высокомолекулярных РНК от низкомолекулярных, что является основным критерием получения микроРНК. Нити ПЭГ при взаимодействии с РНК стерически и электростатически экранируют ее, что способствует ее стабильности в том числе и при действии специфических осадителей [15].

При этом, ПЭГ взаимодействует с высокомолекулярной РНК [16], что приводит к ее экранированию от LiCl и комплексообразование происходит только с низкомолекулярной РНК. Подобный эффект способствует разделению в присутствии 2.5 М LiCl и 96% этилового спирта РНК по их молекулярной массе, малые

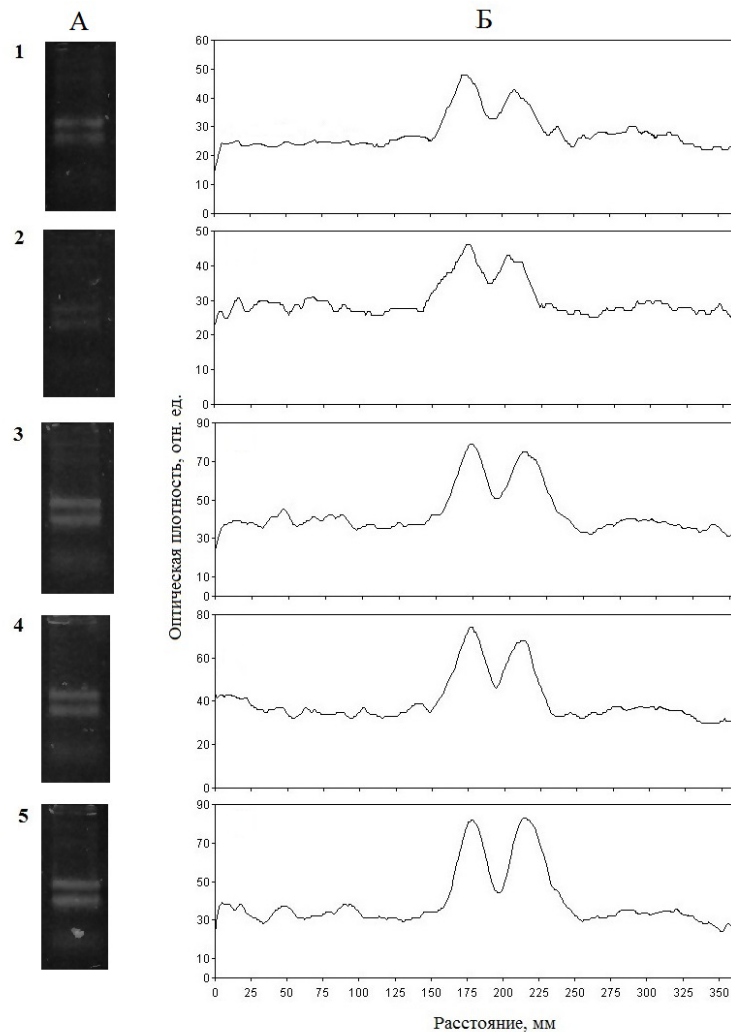


Рис. 2. Экстракция суммарной клеточной РНК из листьев кукурузы при облучении светом разной длины волны. А – качественное определение РНК электрофорезов в 1% агарозном геле. Б – денситограмма образцов суммарной РНК.

Fig. 2. Extraction of total cellular RNA from corn leaves under irradiation with light of different wavelengths. А – qualitative determination of RNA electrophoresis in 1% agarose gel. В – densitogram of total RNA samples.

РНК денатурируются в присутствии этанола. В итоге, ПЭГ с низкой молекулярной массой способствует дестабилизации структуры РНК, что в совокупности со специфическим осадителем хлоридом лития, приводит к более эффективному комплексообразованию и выделению низкомолекулярных РНК.

Проведенная обратная транскрипция РНК образцов с последующим ПЦР-анализом со специфическими праймерами к микроРНК miR165a свидетельствуют о качестве выделенной микроРНК из клеток листьев кукурузы при их облучении

светом разной длины волны. На электрофореграмме, при использовании 1%-го агарозного геля, позволяющего разделять нуклеиновые кислоты на основе их молекулярных масс [17, 18], обнаружено наличие одной полосы в каждой из проб микроРНК с длиной около 80 п.н., что соответствует теоретическому значению размера ампликона (рис. 4).

Применение модифицированной методики выделения РНК с использованием ПЭГ 1500 в качестве элемента разделения высокомолекулярных и низкомолекуляр

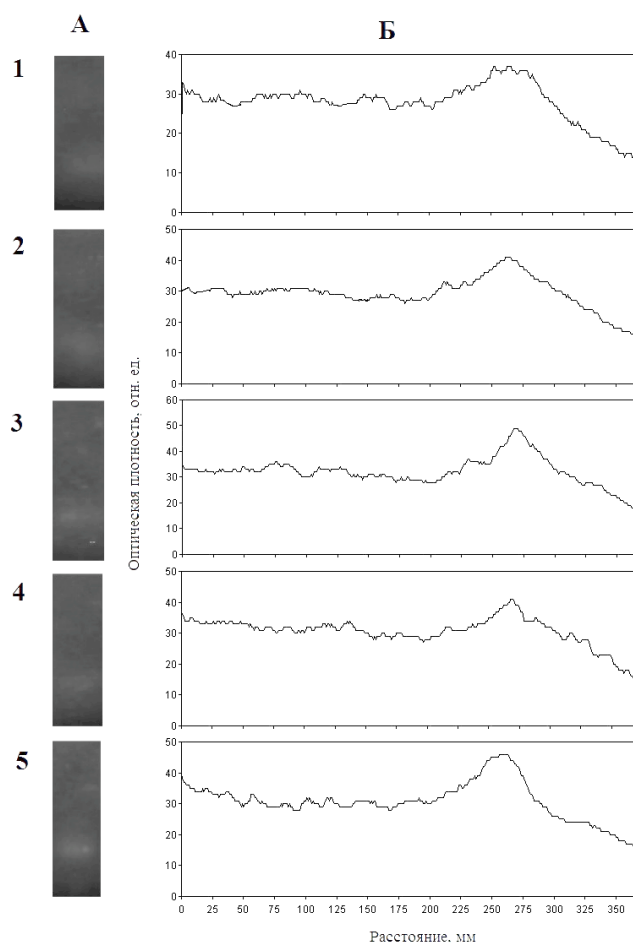


Рис. 3. Выделение микроРНК из суммарной РНК клеток листьев кукурузы при облучении светом разной длины волны. А – качественное определение РНК электрофорезов в 1% агарозном геле. Б – денситограмма образцов суммарной РНК.

Fig. 3. Isolation of microRNA from the total RNA of corn leaf cells when irradiated with light of different wavelengths. А – qualitative determination of RNA electrophoresis in 1% agarose gel. В – densitogram of total RNA samples

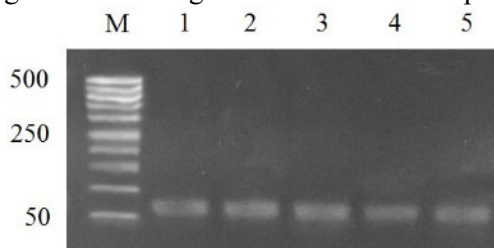


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов со специфическим праймерами к miR165a.
 Fig. 4. Electrophoregram of PCR products with specific primers to miR165a.

ных нуклеиновых кислот позволило получить препараты микроРНК, которые можно применять для дальнейших аналитических исследований.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что модификация фенол-

хлороформного метода экстракции суммарной клеточной РНК позволяет осуществить выделение высококачественной микроРНК, которая может использоваться при исследовании ее содержания в клетках исследуемых организмов методом ПЦР в реальном времени. экспрессии



генов в медицинских исследованиях. Замечательную роль выделению микроРНК из суммарной клеточной РНК сыграло применение в качестве ее специфического соосаждителя ПЭГ 1500. При этом, использование дополнительных компонентов, таких как 2.5 М LiCl и 96% этилового спирта, способствовало не только специфической преципитации микроРНК, но и дополнительной ее очистке от ДНК. Это особенно важно при последующем анализе микроРНК методом ПЦР, поскольку присутствие ДНК в образце может приводить к формированию нецелевых ампликонов и, как следствие, снижению эффективности всего анализа.

Список литературы/References

- 1 Chuang J.C., Jones P.A Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatric Research*. 2007; 61: 24-29.
- 2 Arif K.M.T., Elliott E.K., Haupt L.M., Griffiths L.R. Regulatory Mechanisms of Epigenetic miRNA Relationships in Human Cancer and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)*. 2020; 12: 2922.
- 3 Yao Q., Chen Y. Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2019; 51: 11-17.
- 4 He L., Hannon G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5: 522-531.
- 5 Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001; 294: 853-858.
- 6 Zeng Y., Cullen B.R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*. 2003; 9: 112-123.
- 7 Krichevsky A.M., King K.S., Donahue C.P., Khrapko K., Kosik K.S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*. 2003; 9: 1274-1281.
- 8 Liu C.G., Calin G.A., Meloon B., Gamliel N., Sevignani C., Ferracin M., Dumitru C.D., Shimizu M., Zupo S., Dono M., Alder H., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2004; 101: 9740-9744.
- 9 Nicot N., Hausman J-F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 2005; 56: 2907-2914.
- 10 Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 1996; 6: 986-994.
- 11 Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33: e179.
- 12 Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162: 156-159.
- 13 Kramer M.F. Stem-Loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2011; CHAPTER: Unit15.10: 1-15.

Модификация метода выделения РНК с применением ПЭГ 1500 позволила выделить высококачественной микроРНК из растительных клеток, которая может быть использована в аналитических исследованиях с применением качественной и количественной ПЦР.

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.



14 Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher school, 1990. 351p.

15 Yoshinaga N., Naito M., Tachihara Y., Boonstra E., Osada K., Cabral H., Uchida S. PEGylation of mRNA by Hybridization of Complementary PEG-RNA Oligonucleotides Stabilizes mRNA without Using Cationic Materials. *Pharmaceutics*. 2021; 13: 800.

16 An Z., Wang Q., Hu Y., Zhao Y., Li Y., Cheng H., Huang H. Co-extraction of high-quality RNA and DNA from rubber

tree (*Hevea brasiliensis*). *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11: 9308-9314.

17 Selemenov V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A. Fosfolipidy na fone prirodnyh matric Voronezh. Voronezh: Publishing House. Center "Scientific book". 2020. 318 p.

18 Selemenov V.F., Rudakov O.B., Slavinskaya G.V., Drozdova N.V. Pigmenty pishchevyh proizvodstv (melanoidiny). M: Delhi print. 2008. 246 p.

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

В.О. Чуйкова – 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, Russian Federation

V.O. Chuikova – Bachelor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

A.T. Eprintsev – Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Professor, Doctor of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 10.10.2022; одобрена после рецензирования 16.11.2022; принята к публикации 23.11.2022.

The article was submitted 11.12.2022; approved after reviewing 16.11.2022; accepted for publication 23.11.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.29

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10896

Оптимизация метода выделения нуклеиновых кислот из кефира с помощью сорбента на основе диоксида кремния

Екатерина Юрьевна Нестерова^{1,2}, Мария Ивановна Гладких^{1,2},
Михаил Юрьевич Сыромятников^{1,2}✉, Василий Николаевич Попов^{1,2}

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия,
mihan.vrn@mail.ru✉

²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. Методы выделения нуклеиновых кислот, основанные на использовании сорбционных носителей, являются самыми распространенными. Общий принцип методов твердофазной экстракции основывается на использовании силики, чьи уникальные свойства обеспечивают селективное связывание ДНК и РНК. Цель работы заключалась в проведении анализа качества выделительных систем на основе сорбции с применением гуанидин тиоционата различной концентрации и 4 типов детергентов в составе лизирующего раствора при экстракции нуклеиновых кислот из кефира, как пищевого кисломолочного продукта, содержащего бактериальные и грибковые клетки.

В качестве объекта исследования был использован коммерчески доступный кисломолочный продукт «Кефир» с содержанием бактерий не менее 10^7 КОЕ/г и дрожжей не менее 10^4 КОЕ/г. Для выделения ДНК использовали 99% силику (Sigma-Aldrich, США). В рамках эксперимента рассматривались 3 варианта концентраций гуанидин тиоционата – 3.5 М, 5 М и 6.5 М, а также 4 варианта детергентов – 1% Triton X-100, 1% Tween 20, 1% Tween 80 и 1% СТАВ. Таким образом, экстракция ДНК осуществлялась 12 различными вариантами. ДНК, полученную после экстракции, визуализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием Taq-полимеразы на приборе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). Статистическая обработка данных проводилась с использованием дисперсионного анализа ANOVA в программе STATISTICA.

При проведении электрофореза в агарозном геле было установлено, что использование концентраций гуанидин тиоционата 5 М и 6.5 М способствовало получению более выраженных полос рРНК на электрофореграмме в случае применения Tween 80, а при использовании Tween 20 оптимальная концентрация гуанидин тиоционата для экстракции ДНК составила 5 М.

Анализ влияния детергентов на качество выделения ДНК показал, что минимальная концентрация экстрагированной ДНК была получена в результате использования СТАВ и составляла 1.03 нг/мкл. Применение в качестве детергента Triton X-100 позволило получить концентрацию ДНК в 5.9 раз выше, чем с помощью детергента СТАВ ($p < 0.001$). Значения, полученные в результате экстракции с использованием Tween 80 и Tween 20, превышали значения концентраций при использовании СТАВ в 3.1 и 3.9 раза соответственно ($p < 0.05$).

Проведение Real-Time PCR для оценки параметра порогового цикла (C_t) показало, что полученные значения C_t с праймерами ITS1 и ITS4 во всех вариантах экстракции ДНК не позволяют оценить качество выделения нуклеиновых кислот из грибов. Анализ C_t с праймерами 337F и 1100R позволяет предположить, что оптимальным значением концентрации гуанидин тиоционата является 5 М (среднее значение C_t по всем детергентам составляло 25.0).

По результатам эксперимента было установлено, что при выделении нуклеиновых кислот из кефира необходимо использовать гуанидин тиоционат в концентрации 5 М или 6,5 М. Концентрация выделенной ДНК была выше при использовании Triton X-100 и Tween 20 в качестве детергента. Использование Tween 20 или Tween 80 в качестве детергентов значительно повышало фракцию РНК в препарате нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: выделение ДНК, детергент, гуанидин тиоционат, Real-Time PCR.

Благодарности: работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект 21-74-00065).



Для цитирования: Нестерова Е.Ю., Гладких М.И., Сыромятников М.Ю., Попов В.Н. Оптимизация метода выделения нуклеиновых кислот из кефира с помощью сорбента на основе диоксида кремния // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 893-900. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10896>

Original article

Optimising the method of isolating nucleic acids from kefir using a silica-based sorbent

Ekaterina Yu. Nesterova^{1,2}, Maria I. Gladkikh^{1,2},
Mikhail Yu. Syromyatnikov^{1,2}✉, Vasily N. Popov^{1,2}

¹Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, mihan.vrn@mail.ru✉

²Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Abstract. The most common methods of nucleic acid isolation are those using sorption carriers. The general principle of the methods for solid-phase extraction is based on the use of silica whose unique properties provide for selective DNA and RNA binding. The purpose of the work was to analyse the quality of sorption-based extraction systems using guanidine thiocyanate of various concentrations and 4 types of detergents in the lysis solution when extracting nucleic acids from kefir as a fermented dairy food product containing bacterial and fungal cells.

For the study, we used a commercially available fermented dairy food product “Kefir” with the bacteria content of at least 10^7 CFU/g and yeast content of at least 10^4 CFU/g. 99% silica (Sigma-Aldrich, USA) was used to isolate DNA. The experiment considered 3 variants of guanidine thiocyanate concentrations: 3.5 M, 5 M, and 6.5 M, as well as 4 variants of detergents: 1% Triton X-100, 1% Tween 20, 1% Tween 80, and 1% CTAB. Thus, DNA extraction was carried out in 12 different variants.

DNA obtained after extraction was visualised by electrophoresis in 2% agarose gel. The DNA concentration was measured using a Qubit 4 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The polymerase chain reaction was performed using Taq polymerase on the CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, USA). Statistical data processing was carried out using ANOVA dispersion analysis in the Statistica software.

Electrophoresis in agarose gel showed that using 5 M and 6.5 M concentrations of guanidine thiocyanate contributed to obtaining more pronounced rRNA bands on the electropherogram when using Tween 80, whereas when using Tween 20, the optimal concentration of guanidine thiocyanate for DNA extraction was 5 M.

The analysis of the effect of detergents on the quality of DNA isolation showed that the minimum concentration of extracted DNA was obtained when using CTAB and it was 1.03 ng/μl. Triton X-100 used as a detergent allowed obtaining a DNA concentration 5.9 times higher than with the CTAB detergent ($p < 0.001$). The values obtained from the extraction using Tween 80 and Tween 20 were 3.1 and 3.9 times higher, respectively, than the concentrations when using CTAB ($p < 0.05$). Real-Time PCR conducted to assess the threshold cycle parameter (Ct) showed that the obtained Ct values with ITS1 and ITS4 primers in all variants of DNA extraction do not allow assessing the quality of isolation of nucleic acids from fungi. The analysis of Ct with primers 337F and 1100R suggests that the optimal concentration value for guanidine thionation was 5 M (the average value of Ct for all detergents was 25.0). According to the results of the experiment, it was found that when isolating nucleic acids from kefir, it is necessary to use guanidine thionation at a concentration of 5 M or 6.5 M. The concentration of isolated DNA was higher when using Triton X-100 and Tween 20 as a detergent. The use of Tween 20 or Tween 80 as detergents significantly increased the RNA fraction in the nucleic acid preparation.

Keywords: DNA isolation, detergent, guanidine thiocyanate, Real-Time PCR.

Acknowledgments: this work was supported by Russian Science Foundation (project 21-74-00065)

For citation: Nesterova E.Yu., Gladkikh M.I., Syromyatnikov M.Yu., Popov V.N. Optimising the method of isolating nucleic acids from kefir using a silica-based sorbent. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 893-900. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10896>

Введение

Выделение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) является первичным этапом в

прикладных молекулярно-генетических исследованиях [1], методиках идентификации микроорганизмов [2], клонирование [3], а также диагностике [4,5]. При



выборе метода выделения нуклеиновых кислот учитываются такие параметры, как скорость и качество выделения геномной ДНК, которые получают благодаря стандартизации протоколов [6]. Однако следует отметить, что несмотря на то, что методики выделения нуклеиновых кислот из года в год заметно модифицируются и улучшаются, основные параметры, например, применение гуанидин тиоционата и силики (диоксида кремния), остаются неизменными с момента появления данной технологии [7].

Общий принцип методов твердофазной экстракции нуклеиновых кислот основывается на использовании силики, чьи уникальные свойства обеспечивают селективное связывание ДНК. За счет высокой афинности отрицательно заряженного остова ДНК к положительно заряженным силикатным частицам происходит связывание ДНК с неорганическим носителем, с последующими этапами отмывки от примесей и элюцией очищенного продукта [8-11].

Стандартный набор экстракции нуклеиновых кислот с сорбентом состоит из следующих растворов: лизирующий, сорбент, промывочный, элюирующий буфер [12]. Для полного разрушения всех клеточных структур и высвобождения нуклеиновых кислот из биологического материала необходимо выбрать подходящий вариант пробоподготовки [13]. Применение детергентов способствует разрушению клеточной мембраны и ее компартментов [14]. Детергенты являются компонентами лизирующего раствора благодаря своему солибилизирующему (растворяющему) действию [15]. К основным детергентам, используемым в различных исследованиях для разрушения сложной клеточной организации объектов исследования, относят: Triton, Tween, SDS и СТАВ [16-19]. Следует отметить, что при использовании СТАВ необходима обязательная дополнительная очистка экстрагируемой ДНК/РНК

перед постановкой ПЦР за счет присутствия в элюирующем растворе, помимо нуклеиновой кислоты, дополнительных компонентов – полисахаридов [20]. Оптимизации методики экстракции нуклеиновых кислот происходит за счет преодоления специфические проблем выделения, среди которых высокое фоновое загрязнение (гуминовые кислоты, фульвокислоты и полисахариды), низкий выход и чистота ДНК [21].

Цель исследования – сравнительный анализ качества выделительных систем на основе сорбции с применением гуанидин тиоционата различной концентрации и 4 типов детергентов в составе лизирующего раствора при экстракции нуклеиновых кислот из кефира, как пищевого кисломолочного продукта, который содержит в себе как бактериальный, так и грибковые клетки.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования был использован коммерчески доступный ктисломолочный продукт «Кефир» с содержанием бактерий не менее 10^7 КОЕ/г и дрожжей не менее 10^4 КОЕ/г.

Для выделения ДНК и РНК использовали 99% силику (Sigma-Aldrich, США). В основе лизирующего раствора для экстракции нуклеиновых кислот лежали компоненты (гуанидин тиоционат, Tris-HCl, ЭДТА и детергент), описанные ранее [22]. В рамках эксперимента рассматривались 3 варианта концентраций гуанидин тиоционата – 3.5 М, 5 М и 6.5 М, а также 4 варианта детергентов – 1% Triton X-100, 1% Tween 20, 1% Tween 80 и 1% СТАВ. Таким образом, экстракция нуклеиновых кислот осуществлялась 12 различными вариантами. ДНК, полученную после экстракции, визуализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Измерение на приборе осуществлялось в соответствии

с инструкцией производителя с использованием специализированных тонкостенных пробирок объемом 0.5 см³.

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием Taq-полимеразы на приборе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). Смешивали в пробирке следующие компоненты: 5X реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) – 5 мкл; 5 мкМ прямой праймер – 1 мкл; 5 мкМ обратный праймер – 1 мкл; ДНК – 2 мкл; деионизованная вода – до 25 мкл. Использовали следующий температурный цикл: 95°C 5 мин, 38 циклов: 95°C 15 сек 54°C 30 сек, 72°C 30 сек. В качестве праймеров использовали следующие: для амплификации ДНК грибов –

Статистическая обработка данных проводилась с использованием дисперсионного анализа ANOVA в программе STATISTICA.

Обсуждение результатов

На рисунках 1 и 2 представлены результаты электрофореза образцов, полученных в результате экстракции на основе использования буферов с различной концентрацией гуанидин тиоционата и 4 видов детергентов. При проведении электрофореза в агарозном геле было установлено, что использование Tween 80 и Tween 20 в качестве детергентов в лизирующем растворе обеспечивают эффективную экстракцию РНК, в отличие от та-

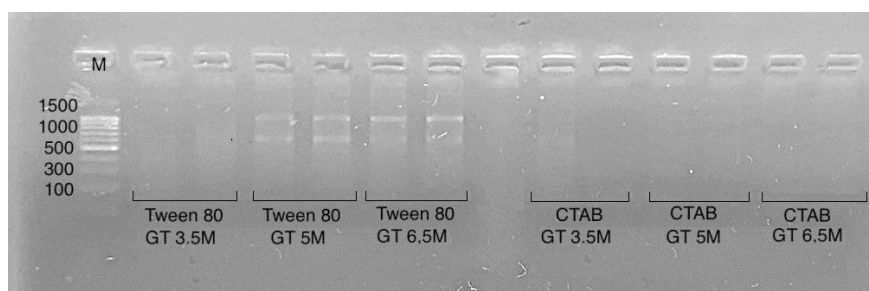


Рис. 1. Электрофореграмма нуклеиновых кислот, полученных в результате экстракции с использованием детергентов Tween 80 и СТАВ. М – маркер известной длины. GT – гуанидин тиоционат

Fig. 1. Electropherogram of nucleic acids obtained by extraction using Tween 80 and CTAB detergents. (M) a marker of known length. (GT) guanidine thiocyanate

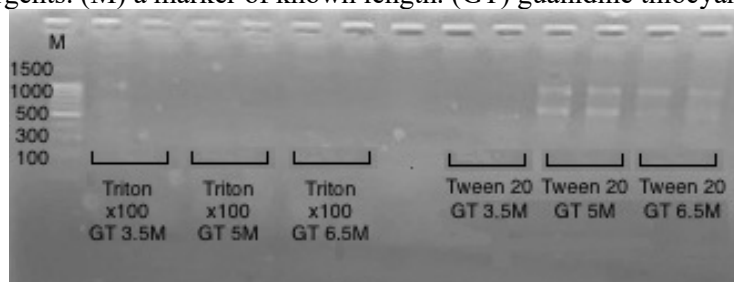


Рис. 2. Электрофореграмма нуклеиновых кислот, полученных в результате экстракции с использованием детергентов Triton X-100 и Tween 20. М – маркер известной длины. GT – гуанидин тиоционат

Fig. 2. Electropherogram of nucleic acids obtained by extraction using Triton X-100 and Tween 20 detergents. (M) a marker of known length. (GT) guanidine thiocyanate

ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG, ITS4 TCCTCCGTTATTGATATGC [23]. Для амплификации ДНК бактерий – 337F GACTCCTACGGGAGGCWGCAG, 1100R GGGTTGCGCTCGTTG [24].

ких детергентов, как Triton X-100 и СТАВ. Было показано, что при концентрациях гуанидин тиоционата 5 М и 6.5 М наблюдались более выраженные полосы рРНК на электрофореграмме в случае

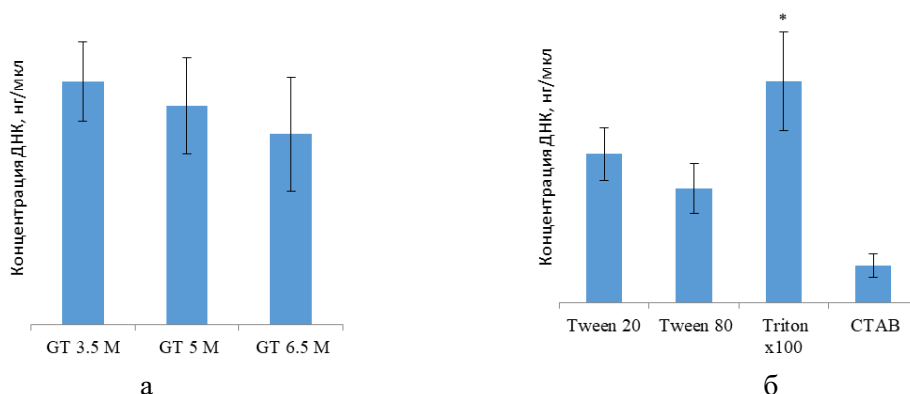


Рис. 3. Диаграммы зависимости концентраций экстрагированной ДНК от молярности гуанидин тиоционата с Tween 80 (а) и детергентов при концентрации гуанидин тиоционата 5 М (б) (различия с Tween 80 и СТАВ статистически достоверны, * $p < 0.05$)

Fig. 3. Diagrams of the dependence of the concentrations of extracted DNA on the molarity of guanidine thiocyanate with Tween 80 (A) and detergents at a concentration of guanidine thiocyanate of 5 M (B) (differences with Tween 80 and CTAB are statistically valid, * $p < 0.05$)

Таблица 1. Средние значения C_t (\pm стандартное отклонение), полученные в результате Real-Time PCR с парами праймеров 337F/1100R и ITS1/ITS4

Table 1. Average C_t (\pm standard deviation) values obtained as a result of Real-Time PCR with 337F/1100R and ITS1/ITS4 primer pairs

Концентрация GT Детергент	3.5 M		5 M		6.5 M	
	337F/1100R	ITS1/ITS4	337F/1100R	ITS1/ITS4	337F/1100R	ITS1/ITS4
Triton X100	20.70 \pm 9.4	36.27 \pm 1.2	24.40 \pm 6.4	32.72 \pm 1.0	32.60 \pm 0.5	34.10 \pm 1.2
Tween 20	19.17 \pm 8.7	35.09 \pm 0.1	26.68 \pm 8.6	35.59 \pm 0.7	18.60 \pm 10.4	34.47 \pm 0.8
Tween 80	15.36 \pm 5.1	34.19 \pm 1.9	24.16 \pm 12.4	34.18 \pm 0.8	31.06 \pm 0.9	33.27 \pm 1.0

применения Tween 80, а при использовании Tween 20 оптимальная концентрация гуанидин тиоционата для экстракции ДНК составила 5 М.

На рисунке 3 представлены полученные при выделении нуклеиновых кислот концентрации ДНК при использовании различных концентраций гуанидин тиоционата с детергентом Tween 80 (А) и 4 типов детергентов при концентрации гуанидин тиоционата 5 М (б).

Было установлено, что различные комбинации концентраций гуанидин тиоционата в буфере не способствовали получению статистически достоверных результатов в изменении концентрации ДНК ($p < 0.05$). Анализ влияние детергентов на качество выделения ДНК показал, что

минимальная концентрация экстрагированной ДНК была получена в результате использования СТАВ и составляла 1.03 нг/мкл. Применение в качестве детергента Triton X-100 позволило получить концентрации в 5.9 раз превышающее предыдущее значение ($p < 0.001$). Значения, полученные в результате экстракции с использованием Tween 80 и Tween 20, превышали значения концентраций при использовании СТАВ в 3.1 и 3.9 раза соответственно ($p < 0.05$).

Далее осуществляли постановку Real-Time PCR для оценки параметра порогового цикла (C_t). В таблице 1 представлены средние значения C_t образцов ДНК с парами праймеров к бактериальной

ДНК (337F/1100R) и грибковой ДНК (ITS1/ITS4).

Значения C_t с праймерами ITS1 и ITS4 во всех вариантах экстракции ДНК варьировало от 32.72 до 37.25, что не позволяет оценить качество выделения нуклеиновых кислот из грибов на основе Real-Time PCR. Анализ значений порогового цикла с праймерами 337F и 1100R позволяет предположить, что оптимальным значением концентрации гуанидин тиоционата является 5 М (среднее значение C_t по всем детергентам составляло 25,0).

Заключение

В рамках эксперимента осуществляли сравнительный анализ качества выделительных систем на основе сорбции на силিকে с применением гуанидин тиоционата различной концентрации и 4 типов

детергентов в составе лизирующего раствора. Концентрация выделенной ДНК была выше при использовании Triton X-100 и Tween 20 в качестве детергента. Использование Tween 20 или Tween 80 в качестве детергентов значительно повышало фракцию РНК в препарате нуклеиновых кислот. Также установлено, что при выделении нуклеиновых кислот из кефира необходимо использовать гуанидин тиоционат в концентрации 5 М или 6.5 М.

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. Cheng H.R., Jiang N. Extremely Rapid Extraction of DNA from Bacteria and Yeasts. *Biotechnol. Lett.* 2006; 28: 55-59. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>
2. Niemi R.M., Heiskanen I., Wallenius K. et al. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods.* 2001; 45: 155-165. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00253-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00253-6)
3. Madhu B., Lakdawala M.F., Gumienny T.L. Small-Scale Extraction of *Caenorhabditis elegans* Genomic DNA. *J. Vis. Exp.* 2022; 184. <https://doi.org/10.3791/63716>
4. Muller F.M., Werner K.E., Kasai M. et al. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by highspeed cell disruption. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 1625-1629. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.6.1625-1629.1998>
5. Paul R., Ostermann E., Wei Q. Advances in point-of-care nucleic acid extrac-

- tion technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. *Biosens. Bioelectron.* 2020; 169: 112592. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112592>
6. Greathouse K.L., Sinha R., Vogtmann E. DNA extraction for human microbiome studies: the issue of standardization. *Genome Biol.* 2019; 20: 212. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1843-8>
 7. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 495-503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
 8. Cady N.C., Stelick S., Batt C.A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors & Bioelectronics.* 2003; 19: 59-66. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(03\)00123-4](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(03)00123-4)
 9. Rimola A., Costa D., Sodupe M. et al. Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. *Chemical Reviews.* 2013; 113: 4216-4313. <https://doi.org/10.1021/cr3003054>



10. Zhang Y., Cremer P.S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006; 10: 658-663. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.020>
11. Poeckh T., Lopez S., Fuller A.O. et al. Adsorption and elution characteristics of nucleic acids on silica surfaces and their use in designing a miniaturized purification unit. *Analytical Biochemistry*. 2008; 373: 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.026>
12. Günal G., Kip Ç., Eda Öğüt S. et al. Comparative DNA isolation behaviours of silica and polymer based sorbents in batch fashion: monodisperse silica microspheres with bimodal pore size distribution as a new sorbent for DNA isolation. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018; 46: 178-184. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1304404>
13. Chen Y., Guo Z., Wang X. et al. Sample preparation. *J. Chromatogr. A*. 2008; 1184: 191-219. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.026>
14. Campos P.F., Gilbert M.T.P. DNA Extraction from Keratin and Chitin. *Methods Mol. Biol.* 2019; 1963: 57-63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_7
15. Linke D. Detergents: an overview. *Methods Enzymol.* 2009; 463: 603-617. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63034-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63034-2)
16. Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*. 2011; 50: 325-328. <https://doi.org/10.2144/000113672>
17. Barazesh A., Sarkari B., Ebrahimi S. et al. DNA extraction from hydatid cyst protoscolices: Comparison of five different methods. *Vet. World*. 2018; 11: 231-234. <https://doi.org/10.14202/vet-world.2018.231-234>
18. Chen F., Ye J., Chio C. et al. A simplified quick microbial genomic DNA extraction via freeze-thawing cycles. *Mol. Biol. Rep.* 2020; 47: 703-709. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05176-w>
19. Teyssier N.B., Chen A., Duarte E.M. et al. Optimization of whole-genome sequencing of Plasmodium falciparum from low-density dried blood spot samples. *Malaria J.* 2021; 20: 116. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03630-4>
20. Demeke T., Ratnayaka I., Phan A. Effects of DNA Extraction and Purification Methods on Real-Time Quantitative PCR Analysis of Roundup Ready Soybean. *J. AOAC Int.* 2009; 92: 1136-1144. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.4.1136>
21. Kuhn R., Böllmann J., Krahl K. et al. Comparison of ten different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples. *J. Microbiol. Methods*. 2017; 143: 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.007>
22. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 495-503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
23. White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 1990, vol. 18, P. 315-322.
24. Techo S., Shiwa Y., Tanaka N. et al. *Enterococcus florum* sp. nov., isolated from a cotton flower (*Gossypium hirsutum* L.) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019; 69: 2506-2513. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003524>

Информация об авторах / Information about the authors

Е.Ю. Нестерова – младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, ВГУИТ, Воронеж. Аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж, Россия

E.Yu. Nesterova – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, VSUIT, Voronezh. Post-graduate student of the Department



М.И. Гладких – младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, ВГУИТ, Воронеж, Россия

М.Ю. Сыромятников – ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж. Доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж, Россия

В.Н. Попов – ректор Воронежского государственного университета инженерных технологий, Воронеж. Заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж, Россия

of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Russian Federation, e-mail: katya.nesterova.1997@mail.ru

M.I. Gladkikh – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, VSUIT, Voronezh, Russian Federation, e-mail: mariya221095@yandex.ru

M.Yu. Syromyatnikov – Leading Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh. Associate Professor of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: mihan.vrn@mail.ru

V.N. Popov – Rector of the Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh. Head of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Russian Federation, e-mail: pvn@vsuet.ru

Статья поступила в редакцию 18.11.2022; одобрена после рецензирования 19.12.2022; принята к публикации 21.12.2022.

The article was submitted 18.11.2022; approved after reviewing 19.12.2022; accepted for publication 21.12.2022.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10906

Особенности сорбции гидроксibenзальдегидов из водных растворов активированным углем ВСК-400

**Елена Сергеевна Свиридова¹, Юлия Александровна Колесова¹,
Ираида Владимировна Воронюк¹✉, Татьяна Викторовна Елисеева¹,
Виктор Михайлович Мухин²**

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, chem.vrn@mail.ru✉

²ЭНПО «Неорганика», Электросталь, Россия

Аннотация. Активные угли (АУ) являются традиционными адсорбентами, применяемыми в различных областях промышленности для очистки газовых и жидких сред. В настоящее время вызывает интерес использование АУ, полученных не только из листовенных пород дерева, но и других источников, например, скорлупы кокоса. Целью работы являлось установление сорбционных характеристик активированного угля ВСК-400 (ЭНПО «Неорганика») относительно некоторых представителей замещенных бензальдегидов. Исследования проводились в статических и динамических условиях. Сравнение изотерм сорбции пара-гидроксibenзальдегида (ПГБА), ванилина и изованилина указывают на большее сродство ВСК-400 к альдегиду, не содержащему в своей структуре эфирную группу. Присутствие в структуре рассматриваемых сорбтивов метоксигруппы и ее расположение относительно карбонильной группы влияет на емкостные характеристики АУ. Сорбция альдегидов в ряду – ПГБА, изованилин, ванилин – уменьшается.

В работе оценено влияние рН и температуры среды на поглощение гидроксibenзальдегидов. Отмечено, что в кислых средах и в области высоких температур сорбция ванилина увеличивалась. В динамических условиях также наблюдалось увеличение рабочей емкости до проскока с ростом температуры раствора, пропускаемого через колонку с углем. Таким образом, в работе оценено влияние внешних условий на емкость активированного угля ВСК-400 относительно ряда гидроксibenзальдегидов, а также установлена возможность практического применения рассматриваемого сорбента для извлечения ПГБА, ванилина и изованилина.

Ключевые слова: активированный уголь, сорбция, ванилин, изованилин, гидроксibenзальдегид.

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-29-01480, <https://rscf.ru/project/22-29-01480/>

Для цитирования: Свиридова Е.С., Колесова Ю.А., Воронюк И.В., Елисеева Т.В., Мухин В.М. Особенности сорбции гидроксibenзальдегидов из водных растворов активированным углем ВСК-400 // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 901-908.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10906>

Original article

Features of sorption of hydroxybenzaldehydes from aqueous solutions by activated carbon VSK-400

**Elena S. Sviridova¹, Yulia A. Kolesova¹, Iraida V. Voronyuk¹✉,
Tatiana V. Eliseeva¹, Viktor M. Mukhin²**

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, chem.vrn@mail.ru✉

²ENPO "Neorganika", Elektrostal, Russian Federation



Abstract. Activated carbons (AC) are traditional adsorbents used in various fields of industry for the purification of gas and liquid media. Currently, the use of AC obtained not only from hardwoods, but also from other sources, for example, coconut shells, is of interest. The aim of the work was to establish the sorption characteristics of activated carbon VSK-400 (ENPO "Inorganic") relative to some representatives of substituted benzaldehydes. The studies were carried out under static and dynamic conditions. Comparison of the isotherms of the sorption of para-hydroxybenzaldehyde (PGBA), vanillin and isovanillin indicates a greater selectivity of VSK-400 to an aldehyde that does not contain an ether group in its structure. The presence of a methoxy group in the structure of the sorbents under consideration and its location relative to the carbonyl group affects the capacity characteristics of the AC. The sorption of aldehydes in the series – PGBA, isovanillin, vanillin – decreases.

The effect of the pH and temperature of the medium on the sorption of hydroxybenzaldehydes is estimated. It was noted that in acidic environments and in the high temperature range, the sorption of vanillin increased. Under dynamic conditions, there was also an increase in the working capacity to a slip with an increase in the temperature of the solution passed through the column. Thus, the paper evaluates the influence of external conditions on the capacity of activated carbon VSK-400 relative to a number of hydroxybenzaldehydes, and also considers the possibility of practical application of the sorbent for the extraction of PGBA, vanillin and isovanilline.

Keywords: activated carbon, sorption, vanillin, isovanillin, hydroxybenzaldehyde.

Acknowledgments: the research is funded by RSF (Russian Science Foundation), project No. 22-29-01480, <https://rscf.ru/project/22-29-01480/>

For citation: Sviridova E.S., Kolesova Yu.A., Voronyuk I.V., Eliseeva T.V., Mukhin V.M. Features of sorption of hydroxybenzaldehydes from aqueous solutions with activated carbon VSK-400. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 901-908. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10906>

Введение

Активные угли (АУ) широко распространены как сорбенты веществ различной природы как из жидких, так и из газовых фаз [1-2]. В настоящее время большое число работ посвящено изучению сорбционных характеристик АУ, полученных не только из традиционного сырья (лиственные породы дерева), но и путем карбонизации скорлупы различных орехов (кокоса, грецкого ореха), рисовой шелухи и т.д. [3-6]. Такие сорбенты зачастую обладают более высокими емкостными характеристиками по сравнению с традиционными аналогами АУ.

В настоящей работе проведено исследование особенностей статической и динамической сорбции некоторых представителей гидроксibenзальдегидов с использованием в качестве сорбента активированного угля, полученного из скорлупы кокосового ореха.

Экспериментальная часть

В качестве сорбента в настоящей работе выбран образец активированного угля ВСК-400 (ЭНПО «Неорганика»), полученный на основе карбонизованной

скорлупы кокосового ореха. Его основные физико-химические характеристики представлены в таблице 1.

На выбранном АУ проводили исследование сорбции ряда гидроксibenзальдегидов из водных растворов. Строение и некоторые физико-химические характеристики сорбтивов приведены в табл. 2. Концентрацию замещенных ароматических альдегидов (Sigma-Aldrich) определяли спектрофотометрически на приборе спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр»).

Исследования проводили в статических и динамических условиях. Равновесные характеристики сорбции изучали на основе анализа изотерм сорбции гидроксibenзальдегидов, полученных методом переменных концентраций при различных температурах. Перемешивание раствора осуществляли при скорости 250 об/мин на орбитальном термостатируемом шейкере. Потенциометрические измерения проводили на иономере И-160МИ. Исследования сорбции ванилина в динамических условиях осуществляли с использованием стеклянной колонки, в которую загружали 10 см³ АУ и пропускали раствор сорбтива сверху вниз со

Таблица 1. Физико-химические характеристики угля ВСК-400 [7,8]
Table 1. Physical-chemical characteristics of VSK-400 AC [7,8]

Адсорбционная активность по йоду не менее, %	90
Суммарный объем пор по воде не менее, см ³ /г	0.7
Эффективный объем микропор, не менее, см ³ /г	0.45
Удельная поверхность, м ² /г	1284
Рабочая температура, °С	5-200

Таблица 2. Физико-химические характеристики исследуемых гидроксibenзальдегидов [9].
Table 2. Physical-chemical characteristics of the studied hydroxybenzaldehydes [9].

Название	4-гидрокси-бензальдегид (ПГБА)	4-гидрокси-3-метоксибензальдегид (ванилин)	3-гидрокси-4-метоксибензальдегид (изованилин)
Растворимость, г/100 см ³	1.38	1	1
Показатель кислотности, рK _a	7.61	7.40	8.89
Длина волны, используемая для определения концентрации альдегида в воде, нм	281	278	278

скоростью 6 ОЗ/ч (ОЗ – объем загрузки угля).

Обсуждение результатов

Ранее установлено, что ВСК-400 проявляет сродство к п-гидроксibenзальдегиду [10]. Вследствие того, что гидроксильная группа в строении исследуемых сорбтивов сообщает им слабокислотные свойства, важно учитывать влияние рН среды на сорбционную емкость АУ. На

рис. 1 рассмотрено влияние кислотности среды на поглощение ванилина ВСК-400. Согласно свойствам 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида (диаграмме распределения молекулярной и ионной форм), при рН>5.5 в растворе помимо недиссоциированной формы, могут присутствовать и ванилат-ионы. Однако, как видно из рис. 1, при переходе среды из кислой в сильнощелочную емкость АУ по альдегиду снижается, это связано с тем, что в

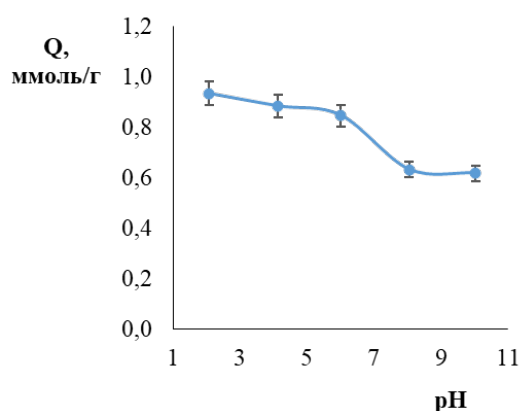


Рис. 1. Зависимость емкости активированного угля ВСК-400 по ванилину от рН раствора (C₀=6 ммоль/дм³).

Fig. 1. The dependence of the activated carbon capacity of VSK-400 on vanillin on the pH of the solution (C₀=6 mmol/dm³).

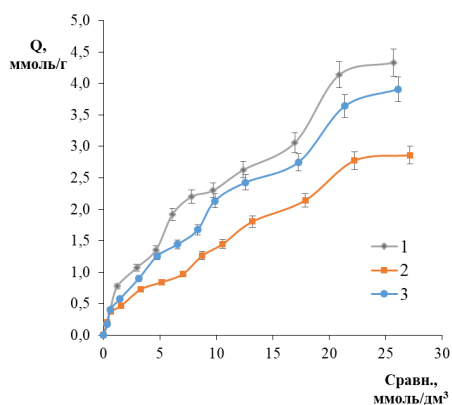


Рис. 2. Изотермы сорбции пара-гидроксибензальдегида (1), ванилина (2) и изованилина (3) активированным углем ВСК-400 при $T=298\text{K}$

Fig. 2. Isotherms of sorption of para-hydroxybenzaldehyde (1), vanillin (2) and isovanillin (3) by activated carbon VSK-400 at $T=298\text{K}$

сильнощелочных растворах происходит конкурентная сорбция гидроксильных ионов на поверхности активированного угля. Далее в работе использовали растворы гидроксибензальдегидов с $\text{pH} < 5.5$ для наиболее эффективного выделения сорбтивов из жидких сред.

В настоящем исследовании оценена возможность применения АУ как сорбента ряда замещенных бензальдегидов, а именно ПГБА, ванилина и изованилина. На рис. 2 отражены изотермы сорбции, полученные в диапазоне концентраций исследуемых сорбтивов от 0.5 до 30 ммоль/дм³. Характер полученных зависимостей свидетельствует о сродстве используемого сорбента к извлечению гидроксибензальдегидов из жидких сред. Отмечено, что на плато изотермы сорбции выходят при концентрации внешнего раствора более 25 ммоль/дм³, при этом коэффициенты распределения альдегидов в системе водный раствор – АУ имеют высокие значения, что говорит о целесообразности применения ВСК-400 для удаления ароматических альдегидов в практических целях (рис. 3). Наиболее

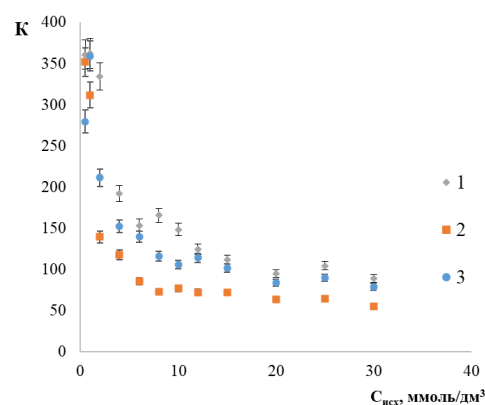


Рис. 3. Зависимость коэффициента распределения пара-гидроксибензальдегида (1), ванилина (2) и изованилина (3) от их концентрации во внешнем растворе в системе ВСК-400 – раствор альдегида ($T=298\text{K}$)

Fig. 3. Dependence of the distribution coefficient of para-hydroxybenzaldehyde (1), vanillin (2) and isovanillin (3) on concentration in an external solution in the system VSK-400 – aldehyde solution ($T=298\text{K}$)

вероятным является адсорбционный характер поглощения гидроксибензальдегидов, при более высоких концентрациях возможна полимолекулярная сорбция за счет реализации на поверхности АУ не только взаимодействия между сорбентом и сорбатом за счет слабых ван-дер-ваальсовых сил, но и сорбат-сорбатных взаимодействий за счет водородных связей.

Отметим, что в исследуемом ряду замещенных бензальдегидов наибольшая емкость активированного угля характерна при сорбции пара-гидроксибензальдегида, чуть ниже емкость по изованилину и ванилину, соответственно. Можно предположить, что наличие в строении сорбтивов метоксигруппы и ее расположение относительно карбонильной группы снижает емкость в результате возникновения пространственных затруднений.

Предварительная оценка механизма сорбции замещенных бензальдегидов осуществлена с использованием формального подхода на основе анализа равновесных характеристик с помощью различных моделей адсорбции:

Таблица 3. Коэффициенты корреляции (R^2) изотерм сорбции гидроксibenзальдегидов активированным углем ВСК-400, представленных в линейных координатах уравнений сорбции.
 Table 3. Correlation coefficients (R^2) of the isotherms of sorption of hydroxybenzaldehydes with activated carbon VSK-400, presented in linear coordinates of the sorption equations.

	Уравнение типа Ленгмюра	Уравнение типа Фрейндлиха	Уравнение типа Темкина	Уравнение Дубинина-Радushkevича
Ванилин	0.747	0.976	0.787	0.621
ПГБА	0.881	0.988	0.858	0.758
Изованилин	0.638	0.987	0.842	0.538

Ленгмюра(1), Фрейндлиха(2), Темкина (3) и Дубинина-Радushkevича (4) [11]:

$$\frac{C_{равн}}{Q} = \frac{1}{Q_{max}} C_{равн} + \frac{1}{b \cdot Q_{max}}, \quad (1)$$

$$\ln Q = \ln \beta_{\phi} + \frac{1}{n} \ln C_{равн}, \quad (2)$$

$$F = \frac{1}{\alpha} \ln b + \frac{1}{\alpha} \ln C_{равн}, \quad (3)$$

$$\ln Q = \ln Q_{max} - k \cdot \varepsilon^2 \quad (4)$$

где Q – величина сорбции при равновесной концентрации $C_{равн}$, ммоль/г; Q_{max} – величина предельной сорбции, соответствующая заполнению мономолекулярного слоя, $F=Q/Q_{max}$ – степень завершенности процесса, b – константа

сорбционного равновесия; α , β_{ϕ} , n , k – константы сорбции; ε – потенциал Поляни.

В таблице 3 приведены величины достоверности аппроксимации полученных зависимостей. Как и для ПГБА [66] сорбция ванилина и изованилина лучше описывается с использованием уравнения сорбции Фрейндлиха, что свидетельствует о экспоненциальной зависимости емкости АУ по альдегидам от их концентрации в равновесном растворе.

При рассмотрении влияния температуры на сорбцию ванилина активированным углем ВСК-400 отмечен эндотермический характер поглощения (рис. 4). Данное явление, возможно, связано с тем, что при увеличении температуры на поверхности АУ образуется больше адсорбционных центров, где может проходить

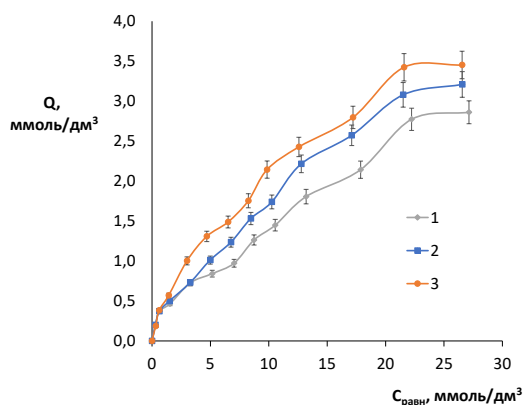


Рис. 4. Изотермы сорбции ванилина активированным углем ВСК-400 при различных температурах: 1 – 298К, 2 – 323К, 3 – 353К

Fig. 4. Isotherms sorption of vanillin onto activated carbon VSK-400 at different temperatures: 1 – 298K, 2 – 323K, 3 – 353K

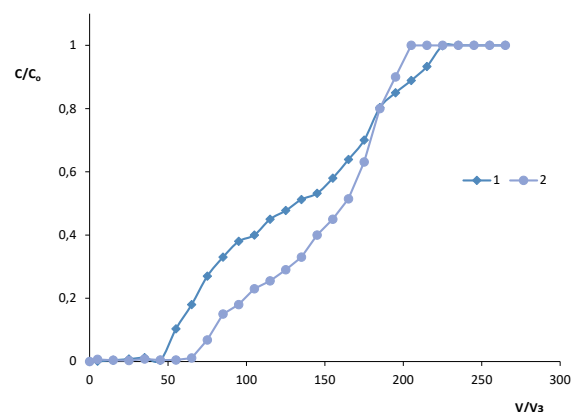


Рис. 5. Выходные кривые сорбции ванилина активированным углем ВСК-400 при различных температурах: 1 – 298К, 2 – 323К.

Fig. 5. Breakthrough curves of sorption of vanillin onto activated carbon VSK-400 at different temperatures: 1 – 298K, 2 – 323K, 3 – 353K

Таблица 4. Динамические характеристики сорбции ванилина активированным углем ВСК-400 при разных температурах ($C_0=6$ ммоль/дм³)

Table 4. Dynamic characteristics of vanillin sorption by activated carbon VSK-400 at different temperatures ($C_0=6$ mmol/dm³)

T, К	V/V ₃ до проскока	Q, ммоль/г до проскока	V/V ₃ до выхода на плато	Q, ммоль/г до выхода на плато
298	45	0.52	235	1.64
323	75	0.86	205	1.71

закрепление молекул сорбтива. Анализ изотерм сорбции при температурах 323 и 353К с использованием формального подхода (уравнения 1-4) показал, что, как и в случае исследований при температуре 298К, наиболее оптимально зависимости описываются с позиции модели Фрейдлиха.

Помимо статических условий проведено изучение сорбции и десорбции ванилина на ВСК-400 в динамических условиях при температурах 298 и 323К (рис. 5). Отмечено, что, как и в равновесных условиях, динамическая емкость сорбента по ванилину увеличивается с ростом температуры раствора, что подтверждает эндотермический характер сорбции гидроксibenзальдегидов. При этом при температуре 323 К проскок ванилина в элюате происходит позднее, чем при 298 К, однако выход на «плато», наоборот, раньше (табл. 4). Таким образом, более эффективно использовать активированный уголь до появления гидроксibenзальдегидов в растворе при температуре 323К.

Заключение

В работе оценены равновесные и неравновесные характеристики сорбции гидроксibenзальдегидов из водных

Список литературы

1. Мухин В.М., Курилкин А.А., Воропаева Н.Л., Лексюкова К.В., Учанов П.В. Место активных углей в экологии и экономике, новые технологии их производства // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2016. Т. 16, № 3. С. 346-353.
2. Юрьев Ю.Л. Тенденции развития

растворов с использованием в качестве сорбента активированного угля ВСК-400.

Наиболее оптимальными условиями извлечения исследуемых сорбтивов является кислотность среды ниже 5.5 и высокие температуры системы. Изотермы сорбции замещенных бензальдегидов носят сложный многоступенчатый характер. Наибольшее сродство АУ проявляет к ПГБА. Наличие в структуре сорбтива метоксигрупп снижает способность к их поглощению активированным углем в связи с возникновением стерических затруднений. При этом расположение эфирной группы в мета-положении относительно карбонильной группы приводит к уменьшению емкости ВСК-400.

Анализ динамических кривых сорбции свидетельствует о возможности практического применения АУ на основе карбонизованной скорлупы кокоса для извлечения гидроксibenзальдегидов из водных растворов.

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.

производства активных углей // *Леса России и хозяйство в них*. 2016. Т. 2, № 57. С. 77-82.

3. Работагов К.В., Ратушная А.Д., Бахтин А.С. Сравнение сорбционной активности различных активных углей // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*. 2022. Т. 8, № 1. С.



224-235.

4. Kim D-G, Boldbaatar S, Ko S-O. Enhanced Adsorption of Tetracycline by Thermal Modification of Coconut Shell-Based Activated Carbon // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022. 19(21). 13741.

5. Brahma D., Nath H., Borah D., Debnath M., Saikia H. Coconut Husk Ash Fabricated Coal-Layered Double Hydroxide Composite for the Enhanced Sorption of Malachite Green Dye: Isotherm, kinetics and thermodynamic studies // *Inorganic Chemistry Communications*. 2022. Vol. 144. 109878.

6. Dada A.O., Ojediran J.O., Abiodun P.O. Sorption of from Aqueous Solution unto Modified Rice Husk: Isotherms Studies // *Advances in Physical Chemistry*. 2013. Vol. 2013. Article ID 842425.

7. Активный уголь ВСК-400. <https://neorganika.ru/produktsiya/aktivnye-ugli/9-produktsiya/18-aktivnyj-ugol-vsk-400> Электронный ресурс. (дата обращения 2.09.2022)

8. Величкина Н.С. Сорбционная технология регенерации иода из сбросных маточных растворов и газовых потоков при иодидном рафинировании циркония : автореф. канд. дисс, М., 2016. – 18 с.

9. Химическая энциклопедия: в 5т. : Т.1. Ред-кол. : И.Л. Кнунянц и др. М.: Сов. энциклоп. 1988. 623 с.

10. Свиридова Е.С., Воронюк И.В., Елисеева Т.В., Селеменев В.Ф., Мухин В.М. Сравнение сорбции 4-гидроксibenзальдегида активированными углями различных марок в статических условиях // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 1. С. 50-57.

11. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел / Ред. Г. Парфит, К. Рочестер. М. Мир. 1986. 488 с.

References

1. Mukhin V.M., Kurilkin A.A., Voropaeva N.L., Leksyukova K.V., Uchanov P.V. A position of active carbons in the ecology and economy, new technologies of their

production. *Sorbtsionnyye I Khromatograficheskiye Protsessy*. 2016; 16(3): 346-353. (In Russ.)

2. Yur'ev Yu.L. Tendencii razvitiya proizvodstva aktivnyh uglej. *Lesnaya Rossiya i hoz'yajstvo v nih*. 2016; 2 (57): 77-82. (In Russ.)

3. Rabotyagov K.V., Ratushnaya A.D., Bahtin A.S. Sravnenie sorbcionnoj aktivnosti razlichnyh aktivnyh uglej. *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Biologiya. Himiya* / 2022; 8(1): 224-235. (In Russ.)

4. Kim D-G., Boldbaatar S., Ko S-O. Enhanced Adsorption of Tetracycline by Thermal Modification of Coconut Shell-Based Activated Carbon. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022; 19(21): 13741. <https://doi.org/10.3390/ijerph192113741>

5. Brahma D., Nath H., Borah D., Debnath M., Saikia H. Coconut Husk Ash Fabricated Coal-Layered Double Hydroxide Composite for the Enhanced Sorption of Malachite Green Dye: Isotherm, kinetics and thermodynamic studies. *Inorganic Chemistry Communications*. 2022; 144: 109878. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109878>

6. Dada A.O., Ojediran J.O., Olalekan A.P. Sorption of from Aqueous Solution unto Modified Rice Husk: Isotherms Studies. *Advances in Physical Chemistry*. 2013; 2013: Article ID 842425. <https://doi.org/10.1155/2013/842425>

7. Aktivnyj ugol' VSK-400. <https://neorganika.ru/produktsiya/aktivnye-ugli/9-produktsiya/18-aktivnyj-ugol-vsk-400> Elektronnyj resurs. (data obrashcheniya 2.09.2022)

8. Velichkina N.S. Sorbcionnaya tekhnologiya regeneracii ioda iz sbrosnyh matochnyh rastvorov i gazovyh potokov pri iodidnom rafinirovanii cirkonija : avtoref. kand. diss, М., 2016. 18 p. (In Russ.)

9. Himicheskaya enciklopediya : V 5t. : T.1. Red-kol. : I. L. Knunyanc et al. М., Sov. enciklop. 1988. 623 p. (In Russ.)

10. Sviridova E.S., Voronyuk I.V., Eliseeva T.V., Selemenov V.F., Mulin V.M.



Sravnienie sorbcii 4-gidroksibenzal'degida aktivirovannymi uglyami razlichnyh marok v staticheskikh usloviyah, Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2022;

22(1): 50-57. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9020>

11. Adsorbtsiya iz rastvorov na poverhnosti tverdyh tel / Red. G. Parfit, K. Rochester. M. Mir. 1986. 488 s. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Е.С. Свиридова – студентка магистратуры кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Ю.А. Колесова – студентка кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

И.В. Воронюк – к.х.н., доцент кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

В.М. Мухин – начальник лаборатории АУЭ-СиК, д.тех.н., профессор, Электростальское научно-производственное объединение «Неорганика», Электросталь, Россия

E.S. Sviridova – Master student, Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Yu.A. Kolesova – student, Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

I.V. Voronyuk – Assistant Professor, Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: chem.vrn@mail.ru

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

V.M. Mukhin – Head of the Laboratory of active carbons, elastic sorbents and catalysts, D. Tech. Sci., Professor, Elektrostal Scientific and Production Association "Inorganic", Elektrostal, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 15.09.2022; одобрена после рецензирования 18.10.2022; принята к публикации 26.10.2022.

The article was submitted 15.09.2022; approved after reviewing 18.10.2022; accepted for publication 26.10.2022.



Письмо в редакцию

Исправления в статье В.И. Дейнеки, Т.Г. Буржинской и Л.А. Дейнеки «Разделение каротиноидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ: механизм удерживания и метиленовая селективность на «мономерной» стационарной фазе», опубликованной в журнале «Сорбционные и хроматографические процессы». 2022. Т. 22, № 4 С. 393-405.

В статье на странице 399 в правой колонке в уравнении (7) обнаружена ошибка. Правильная запись уравнения для расчета «мертвого» времени должна иметь вид:

$$t_R(n+2) = a \cdot t_R(n) + b. (7)$$

Дейнека В.И., Т.Г. Буржинская, Л.А. Дейнека.

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 29.12.2022. Формат 60×84 ½

Дата выхода в свет 27.01.2023

Усл. печ. л. 14,18. Тираж 250 экз. Заказ 238

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+