

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Научный журнал
Выходит 6 раз в год

Том 23, № 2, 2023

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)
Т.Н. Попова, д-р биол.наук, проф. (Воронеж)
SenGupta Arup, Ph.D., prof. (Lehigh University, Bethlehem, U.S.A)
С.М. Староверов, д-р хим.наук (МГУ, Москва)
Р.Х. Хамизов, д-р хим.наук (ГЕОХИ РАН, Москва)
В.Ю. Хохлов, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)
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, 2023

SORBTSIONNYE I KHROMATOGRAFICHESKIE PROTSESSY (SORPTION AND CHROMATOGRAPHY PROCESSES)

Scientific journal
Published 6 times per year

Volume 23, No 2, 2023

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», Electoslal')

B.F. Myasoedov, Academician of the RAS, Dr.Sc., Prof.
(IPEC RAS, Moscow)

P.N. Nesterenko, Dr.Sc., Prof. (MSU, Moscow)

I.A. Platonov, Dr.Sc., Prof. (SSAU, Samara)

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

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

S.M. Staroverov, Dr.Sc., Prof. (MSU, Moscow)

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

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

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, 2023

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

2023, Том 23, №2



Выходит 6 раз в год

CONTENTS

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<p>Платонов И.А., Муханова И.М., Колесниченко И.Н., Брыксин А.С. Изучение возможности получения постоянных концентраций органорастворимых аналитов в органических средах в процессе эксплуатации монолитных хромато-десорбционных систем в статическом режиме</p>	158-170	<p>Platonov I.A., Mukhanova I.M., Kolesnichenko I.N., Bryksin A.S. Study of the possibility of obtaining constant concentrations of organically soluble analytes in organic media during the operation of monolithic chromato-desorption systems in a static mode</p>
<p>Дейнека В.И., Чулков А.Н., Олейниц Е.Ю., Пронин И.С., Блинова И.П., Тыняная И.И., Саласина Я.Ю., Селеменев В.Ф. Особенности определения энтальпии сорбции антоцианов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ</p>	171-181	<p>Deineka V.I., Chulkov A.N., Oleinits E.Yu., Pronin I.S., Blinova I.P., Tynyanaya I.I., Salasina Ya.Yu., Selemenov V.F. Peculiarities of the determination of the sorption enthalpy of anthocyanins under conditions of reverse-phase HPLC</p>
<p>Платонов И.А., Платонов В.И., Новикова Е.А., Иголкин А.А., Ледяев М.Е. Оптимизация хроматографического анализа путем использования нового композиционного теплоизоляционного материала на основе аэрогеля и полимерной матрицы в составе термостата газового микрохроматографа</p>	182-188	<p>Platonov I.A., Platonov V.I., Novikova E.A., Igolkin A.A., Ledyayev M.E. Optimization of chromatographic analysis by using a new composite heat insulation material based on aerogel and a polymer matrix as part of a thermostat of a gas microchromatograph</p>
<p>Муслимов И.Н., Гуськов В.Ю. Особенности супрамолекулярного хирального распознавания при адсорбции на поверхности кристаллов орто-толуиловой кислоты</p>	189-198	<p>Muslimov I.N., Guskov V.Yu. Peculiarities of supramolecular chiral recognition upon adsorption on the surface of ortho-toluic acid crystals</p>
<p>Шелехова Н.В. Экспресс метод определения анионов в алкогольных напитках на основе сочетания КЭ-КД</p>	199-215	<p>Shelekhova N.V. Express method for the determination of anions in alcoholic beverages based on the CE-CD combination</p>
<p>Каримов Х.Р., Староверова А.В., Токмачев М.Г., Ферাপонтов Н.Б., Тробов Х.Т. Применение композита поливиниловый спирт – магнетит для повышения точности метода оптической микрометрии</p>	216-224	<p>Karimov Kh.R., Staroverova A.V., Tokmachev M.G., Ferapontov N.B., Trobov Kh.T. Application of composite polyvinyl alcohol – magnetite for increase of the accuracy of optical micrometry method</p>

<p>Чернова А.П., Шорманов В.К., Цацуа Е.П., Пугачёва О.И., Тарасова О.В. Применение методов обращённо-фазовой хроматографии для определения ди-трет-бутилфенолов в биологических жидкостях</p> <p>Шашков М.В., Долгушев П.А. Новая неподвижная фаза на основе ионной жидкости для двумерной газовой хроматографии с высокой селективностью к ароматическим анализам</p> <p>Губин А.С., Кушнир А.А., Суханов П.Т. Он-лайн концентрирование с применением магнитного молекулярно импринтированного сорбента и ГХ-МС определение бисфенола А в природных средах</p> <p>Компанцева Е.В., Сливкин А.И. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в количественном анализе гидроксикоричных кислот растений, произрастающих в Российской Федерации</p> <p>Вандышев Д.Ю., Хмелевская Т.Н., Газин В.Ю., Шихалиев Х.С. Применение методов ТСХ и ВЭЖХ/МС для оптимизации условий синтеза 10-аминобензо[4,5]имидазо[1,2-а]пиримидинов</p> <p>Кузнецова Т.С., Бураков А.Е., Пасько Т.В., Буракова И.В., Ананьева О.А., Меметова А.Е., Ткачев А.Г. Анализ эффективности сорбционного удаления цинка из водных растворов наноккомпозитом на основе оксида графена и углеродных нанотрубок</p> <p>Анохина Г.Б., Селиванов А.Ю., Грязев А.С., Епринцев А.Т., Чухлебова О.Е. Разработка эффективного метода очистки ДНК при бисульфитной конверсии с использованием оксида кремния в качестве сорбента</p> <p>Федорин Д.Н., Чуйкова В.О., Епринцев А.Т. Идентификация электрофоретическим способом продуктов рестрикционного анализа по сайту GATC геномной ДНК пшеницы при солевом стрессе</p> <p>Некрологи</p>	<p>225-235</p> <p>236-243</p> <p>244-254</p> <p>255-268</p> <p>269-279</p> <p>280-289</p> <p>290-298</p> <p>299-306</p>	<p>Chernova A.P., Shormanov V.K., Tsatsua E.P., Pugacheva O.I., Tarasova O.V. The use of reversed-phase chromatography methods for the determination of di-tert-butylphenols in biological fluids</p> <p>Shashkov M.V., Dolgushev P.A. New ionic liquid based stationary phase for 2D gas chromatography with high selectivity to aromatic analytes</p> <p>Gubin A.S., Kushnir A.A., Sukhanov P.T. On-line concentration using a magnetic molecularly imprinted sorbent and GC-MS determination of bisphenol A in natural media.</p> <p>Kompantseva E.V., Slivkin A.I. High performance liquid chromatography in the quantitative analysis of hydroxycinnamic acids in plants growing in the Russian Federation</p> <p>Vandyshev D.Yu., Khmelevskaya T.N., Gazin V.Yu., Shikhaliev Kh.S. Application of TLC and HPLC/MS methods for the optimize of the conditions for the synthesis of 10-amino-benzo[4,5]imidazo[1,2-A]pyrimidines</p> <p>Kuznetsova T.S., Burakov A.E., Pasko T.V., Burakova I.V., Ananyeva O.A., Memetova A.E., Tkachev A.G. Analysis of the efficiency of zinc sorption from aqueous solutions by nanocomposite based on graphene oxide and carbon nanotubes</p> <p>Anokhina G.B., Selivanov A.Yu., Gryazev A.S., Eprintsev A.T., Chukhlebova O.E. Development of an effective method for DNA purification during bisulphite conversion using silicon oxide as a sorbent.</p> <p>Fedorin D.N., Chuikova V.O., Eprintsev A.T. Electrophoretic identification of restriction analysis products at the GATC site of wheat genomic DNA under salt stress</p> <p>Necrology</p>
---	---	---



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11140

Изучение возможности получения постоянных концентраций органорастворимых аналитов в органических средах в процессе эксплуатации монолитных хромато-десорбционных систем в статическом режиме

**Игорь Артемьевич Платонов[✉], Ирина Михайловна Муханова,
Ирина Николаевна Колесниченко, Александр Сергеевич Брыксин**

¹Самарский национально-исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, Россия, pia@ssau.ru[✉]

Аннотация. Разработка и совершенствование методов и средств приготовления стандартных образцов состава, веществ и материалов является одной из актуальных задач современной аналитической химии. Подобные образцы широко используют для градуировки аналитических приборов, контроля правильности результатов химического анализа, создания модельных сред для ускоренных испытаний и изучения механизма протекания различных реакций и процессов, оценки эффективности катализаторов, создания искусственных газовых и жидких сред. Таким образом, круг потенциальных потребителей газовых смесей известного состава не ограничивается только химиками-аналитиками, а также включает большое число специалистов различных областей науки и производства.

В работе представлены результаты аналитического пути решения этой задачи – разработка и изготовление монолитных хромато-десорбционных систем (ХДС), с использованием которых представляется возможным получать растворы органических растворителей с известным содержанием целевого вещества статическим способом. Объект исследования представляет собой полимерный стержень, получаемый в результате полимеризации двухкомпонентной эпоксидной смолы, в котором аналит, предварительно нанесенный на нанодисперсный адсорбент, равномерно распределен в объеме полимера. Проведена экстракция аналитов из ХДС при различных температурных и барометрических условиях в статическом режиме экстракции. Результаты проведенной работы могут быть использованы для создания растворов органических растворителей с известным содержанием целевого вещества.

Ключевые слова: газовая хроматография, градуировочные смеси, статические методы, хромато-десорбционные системы, полимеры, органические растворители, эпоксидные смолы

Для цитирования: Платонов И.А., Муханова И.М., Колесниченко И.Н., Брыксин А.С. Изучение возможности получения постоянных концентраций органорастворимых аналитов в органических средах в процессе эксплуатации монолитных хромато-десорбционных систем в статическом режиме // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 158-170. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11140>

Original article

Study of the possibility of obtaining constant concentrations of organically soluble analytes in organic media during the operation of monolithic chromato-desorption systems in a static mode

**Igor A. Platonov[✉], Irina M. Mukhanova,
Irina N. Kolesnichenko, Alexander S. Bryksin**

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

Abstract. The development and improvement of methods and means for the preparation of standard samples of composition, substances and materials is one of the urgent tasks of modern analytical chemistry. Such sam-



ples are widely used for calibrating analytical instruments, checking the correctness of chemical analysis results, creating model environments for accelerated testing and studying the mechanism of various reactions and processes, evaluating the effectiveness of catalysts, and creating artificial gas and liquid media. Thus, the range of potential consumers of gas mixtures of known compositions is not limited to analytical chemists, but also includes a large number of specialists in various areas of science and production.

The study presents the results of an analytical solution of the problem - the development and manufacture of monolithic chromato-desorption systems (CDS), the use of which allows to obtain solutions of organic solvents with a known content of the target substance by a static method. The object of study is a polymer rod obtained as a result of polymerization of a two-component epoxy resin, in which the analyte, previously applied to a nanodispersed adsorbent, is uniformly distributed in the polymer volume. The extraction of analytes from CDS was carried out under various temperature and barometric conditions in a static extraction mode. The results of this study can be used to create solutions of organic solvents with a known content of the target substance.

Keywords: gas chromatography, calibration mixtures, static methods, chromato-desorption systems, polymers, organic solvents, epoxy resins.

For citation: Platonov I.A., Mukhanova I.M., Kolesnichenko I.N., Bryksin A.S. Study of the possibility of obtaining constant concentrations of organically soluble analytes in organic media during the operation of monolithic chromato-desorption systems in a static mode. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 158-170. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11140>

Введение

Методы получения газовых смесей, содержащих известное количество целевого компонента, разделяют на статические и динамические [1-5].

В отличие от статических способов, в которых приготовление стандартных газовых смесей (СГС) происходит в замкнутой системе, динамические способы основаны на введении целевых компонентов в поток подвижной фазы. Эти методы практически не имеют ограничений по природе и концентрациям целевых компонентов и могут быть использованы для приготовления стандартных смесей (СС) как газообразных компонентов, а также паров, жидкостей органических и неорганических соединений.

По механизму насыщения потока газаразбавителя динамические методы приготовления СГС подразделяют на равновесные и неравновесные. Равновесные динамические методы основаны на распределении целевых компонентов между газовой и конденсированной (жидкой или твердой) фазами. Для данных систем нехарактерна зависимость концентрации аналитов от объемной скорости потока газовой фазы, если обеспечивается условие межфазного равновесия, что присуще неравновесным динамическим методам.

Среди множества используемых неравновесных динамических методов

приготовления СГС широкое применение получили диффузионный и мембранный методы, а среди равновесных – полибарботажный, хромато-десорбционный и хромато-мембранный способы [6].

Диффузионный метод основан на диффузии паров целевого вещества, находящегося в жидком агрегатном состоянии, через капилляр с определенными геометрическими параметрами в поток газа-разбавителя [4, 6]. Метод довольно прост в исполнении и обеспечивает возможность получения газовых смесей с очень высокими (до нескольких г/дм³) концентрациями целевых компонентов. Многокомпонентные газовые смеси, как правило, генерируют с использованием нескольких диффузионных ячеек, которые снабжены капиллярами с различными геометрическими размерами [7, 8].

К недостаткам данного метода можно отнести возможность получения СГС только достаточно летучих соединений и необходимость термостатирования установки с точностью поддержания температуры до $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Мембранный метод основан на проникновении (диффузии) молекул целевых компонентов в поток газаразбавителя через мембрану, в качестве которой используют проницаемые для летучих веществ стенки ампулы или запаянной трубки из полимерных материалов. Ампулу предварительно заполняют целевым

веществом в сжиженном, жидком или твердом агрегатном состоянии.

В настоящее время мембранный метод является наиболее популярным динамическим методом приготовления СГС, а функционирующие на его основе так называемые «источники микропотоков газов и паров» входят в состав государственного первичного эталона молярной доли и массовой концентрации компонентов в газовых средах [6].

Несомненными достоинствами мембранного метода являются: возможность генерирования СГС практически любых органических и неорганических веществ, включая агрессивные и реакционноспособные, за исключением наиболее низкотемпературных газов; возможность генерирования СГС в широком концентрационном диапазоне; высокая степень изученности процесса и его метрологического обоснования; большой выбор генераторов газовых смесей, функционирующих на базе этого метода; легкость автоматизации и простота обслуживания этих генераторов.

К недостаткам рассматриваемого метода по сравнению с другими можно отнести относительно высокую стоимость оборудования, длительность выхода на рабочий режим генерирования СГС и необходимость тщательного термостатирования процесса с погрешностью поддержания температуры не менее $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Следует также отметить необходимость постоянного и точного взвешивания ампул или трубок с рабочей жидкостью в процессе генерирования СГС для расчета точных концентраций целевых компонентов.

Полибарботажный метод основан на принципе многоступенчатой газовой экстракции летучего вещества из малолетучей жидкости потоком газовой фазы, подающейся с постоянной объемной скоростью. Полибарботажная система состоит из последовательно соединенных сосудов, содержащих раствор летучего вещества в нелетучей жидкости с различными начальными концентрациями [9-11].

Данная система позволяет получать поток газа с постоянной концентрацией только на начальном временном этапе работы, в процессе дальнейшей эксплуатации концентрация аналита в СГС экспоненциально уменьшается. Оптимальной является система с тремя сосудами в составе многоступенчатой системы. Меньшее количество ступеней не обеспечивает стабильности поддержания состава СГС, а большее не приводит к пропорциональному увеличению эффективности [6].

Хромато-мембранный способ основан на генерировании СГС при прохождении потока газа-экстрагента по микропорам бипористой гидрофобной матрицы, контактирующим с макропорами, по которым перемещается генерирующий водный раствор целевых компонентов [12]. В пористой среде резко возрастает площадь межфазной поверхности жидкость-газ и скорость установления межфазного равновесия по сравнению с традиционным барботированием. Это позволяет при прочих равных условиях использовать для генерирования СГС на порядок более высокие расходы газа-экстрагента [13].

Использование хромато-мембранного способа позволяет получать стабильные в течение нескольких часов СГС с микроконцентрациями полярных органических и неорганических веществ на уровне нескольких $\text{мг}/\text{м}^3$ и ниже. Достоинствами данного метода являются быстрое время выхода на стационарные значения целевых компонентов в потоке газа-экстрагента (менее минуты), возможность создания СГС с заранее заданными концентрациями целевых компонентов.

Объемы генерируемых СГС в хромато-мембранном методе могут быть увеличены за счет применения композиционных матриц большего объема, сорбционно-активных материалов с большими коэффициентами адсорбции по отношению к целевым компонентам и увеличения содержания этих материалов в матрице [14].



Хромато-десорбционный способ получения СГС основан на равновесном насыщении летучими соединениями потока инертного газа при его прохождении через хромато-десорбционную систему (ХДС). В качестве носителя могут быть использованы полимерные, модифицированные инертные, неорганические и наноструктурированные сорбенты.

Процесс получения газовых смесей хромато-десорбционным способом проводят в две стадии: хромато-сорбционная стадия, заключается в равновесном насыщении сорбента летучими органическими соединениями (ЛОС) при температуре выше рабочих температур системы; хромато-десорбционная стадия, заключается в десорбции ЛОС при прохождении через систему инертного газа при температуре ниже температуры насыщения.

Таким образом, регулируется величина константы распределения веществ в системе сорбент-газ, что обеспечивает получение потоков с заданным содержанием ЛОС, при этом не требуется дополнительного разбавления и изменения других параметров системы. [15]. При использовании хромато-десорбционного способа требуется в 10 раз меньше реактивов (по сравнению с другими динамическими способами создания стандартных газовых смесей) и отсутствует необходимость утилизации отработанных растворов, что соответствует принципам «зеленой» химии. Достоинствами способа являются стабильность, высокая точность приготовленных смесей, простота аппаратного оформления и эксплуатации, а также возможность получения многокомпонентных смесей в одном цикле, что открывает возможность миниатюризации и применения хромато-десорбционных систем в полевых условиях [6,15].

Стоит отметить тот факт, что проблемы, связанные с приготовлением стандартных сред, не ограничиваются только газовыми растворами – проблема создания стандартных жидких сред в

настоящее время особенно актуальна [6]. На сегодняшний день одним из недостаточно изученных динамических методов изготовления смесей является создание потока органических или неорганических растворителей с определенным содержанием целевого компонента в среде монолитной полимерной матрицы.

Монолиты представляют собой разделительную среду, состоящую из непрерывного, единого блока вещества, изготовленного с помощью полимеризации, перенос вещества в котором происходит за счёт конвективного потока внутри пор полимерной матрицы. Скорость разделения в колонках с монолитным наполнителем, таким образом, намного выше, чем скорость разделения в гранулированных стационарных фазах, так как для них перенос вещества ограничен скоростью диффузии через частицы.

Научный интерес к монолитным фазам появился во второй половине прошлого века. Первые попытки изготовления сплошной и пористой стационарной фазы, состоящей из полимерного геля, были предприняты на рубеже 1960-х и 1970-х годов и не привели к успеху из-за малой проницаемости полимерного монолита элюентом [16].

В 1970-1973 годах были проведены исследования по использованию полиуретановых пен в качестве монолитной матрицы для разделения алифатических, линейных и ароматических углеводородов [17-19] в газо-адсорбционной хроматографии. Посредством модифицирования полимера серьёзно повысило селективность, эффективность разделения и ёмкость загрузки газохроматографической системы. В некоторых конфигурациях удавалось достичь достаточного слипания монолита со стеклянной колонкой, однако полностью решить проблему проникновения элюента в пространство между полимером и стенкой колонки, а также проблему разрыва полимерных цепей и образования полостей между бло-

ками сжатого после высушивания полимера не удавалось. Данное обстоятельство тормозило развитие монолитных наполнителей и их использование в аналитических системах.

Вскоре после этих исследований миру были представлены капиллярные колонки [20], особенностью которых стало нанесение слоя сорбента на стенки колонок при сохранении длинного пустого канала посередине капилляра. Такая конфигурация, обеспечивая отличную проницаемость для газового потока и позволяя легко увеличить количество теоретических тарелок за счёт удлинения капилляра, в итоге быстро завоевала популярность среди учёных-хроматографистов, а исследования монолитных наполнителей отошли далеко на задний план.

Само слово «монолит» в контексте хроматографии впервые появилось в 1993 году в одной из статей книги о разделительных и прочих технологических свойствах целлюлозы и использовалось там для описания блока модифицированной целлюлозной губки, предназначенной для разделения полимеров [21].

Ф. Швеце предложил называть монолитами неподвижную фазу, состоящую из единого блока пористого материала, такого как органический полимер, неорганическое вещество или их комбинация, изготавливаемого обычно с помощью реакций поликонденсации, полимеризации, реакций клик-химии и других процессов, которые проводятся в пространстве, ограниченном формовочной матрицей, колонкой, капилляром или поверхностью подложки» [22].

В период 1980-1990 хх годов работы многих научно-исследовательскими групп ученых (под руководством Б.Г. Беленького, Т.Б. Тенниковой, Ф. Швеца, С. Хьертена) доказали, что монолитный полимерный наполнитель обладает многообещающим потенциалом и очевидными преимуществами, и сделали это настолько явным, что такой концепт раз-

делительной среды удалось наконец популяризовать достаточно широко в научном сообществе, а работа Ф. Швеца от 1992 года до сих пор остаётся одной из самых цитируемых публикаций по теме монолитных разделительных сред [23-26].

Прочнее всего к настоящему моменту монолитные матрицы укрепились в качестве стационарных фаз для жидкостной хроматографии для разделения биологических макромолекул, в том числе белковых, с высокими показателями селективности и эффективности разделения [27].

В составе установок капиллярной ОФ ВЭЖХ монолитные стационарные фазы используются для разделения стандартных белков, изоформ белков [27], а также антител, олигонуклеотидов и крупных пептидов [28].

Монолитные стационарные фазы все чаще применяются в ионно-обменной, гидрофильной и газовой хроматографии для анализа ионных органических и неорганических соединений [29], белков и пептидов [27] и малолетучих органических веществ [30].

Широкий круг применения монолитных матриц свидетельствует о том, насколько прочно они вошли в обиход инструментальных методов аналитической химии в качестве наполнителей хроматографических колонок. Однако, помимо хроматографии, монолиты находят своё применение в ещё одной научно-технической области – как твёрдые носители для создания водных, органических и водно-органических жидких сред, включая смеси суспензионного и эмульсионного типа, с известным содержанием аналита.

Целью настоящего исследования являлась сравнительная оценка работы ХДС в жидких органических средах при различных температурах и давлении в статическом режиме экстракции.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлись монолитные ХДС, полученные в результате



полимеризации двухкомпонентной эпоксидной смолы, в которой анализ, предварительно нанесенный на нанодисперсный адсорбент, был равномерно распределен в объеме полимера. В работе были изучены характеристики извлечения анализа из таких систем. При изготовлении ХДС в качестве материала матрицы использовали модифицированную двухкомпонентную эпоксидную смолу. Нанодисперсным адсорбентом являлся пиро-генный гидрофобный диоксид кремния. В качестве органической среды использовали *n*-октан – малолетучий предельный неполярный органический растворитель. В качестве анализов были выбраны несколько предельных жирных кислот (ЖК) – тетрадекановая (C14), пентадекановая (C15), гексадекановая (C16), октадекановая (C18). Исследуемые анализы практически нерастворимы в воде и имеют высокую растворимость в неполярных органических растворителях.

Изготовление экспериментальных образцов монолитных ХДС производили в несколько стадий:

- 1) нанесение анализа на нанодисперсный адсорбент;
- 2) смешивание приготовленного адсорбента с жидким полимером;
- 3) полимеризация смеси.

Нанесение анализа на нанодисперсный адсорбент проводили следующим способом: смешивали раствор органической кислоты и нанодисперсный адсорбент, после тщательного перемешивания анализа и адсорбента выпаривали органический растворитель с помощью ротационного испарителя. Следовые количества растворителя удаляли в сушильном шкафу. Измельченный однородный аэросил, содержащий ЖК, добавляли к жидкому полимеру.

Для полимеризации образца была спроектирована и изготовлена силиконовая форма, в которую заливали полученную смесь.

Таким образом, было получено несколько экспериментальных образцов

монолитных ХДС с габаритными размерами 100 мм×7 мм×3.5 мм, состоящие из полимерной матрицы, нанодисперсного адсорбента и анализа. Массовая доля каждого исследуемого анализа по отношению к массе полимера составляла $20\pm 1\%$.

Для оценки возможности применения изготовленного материала в качестве матрицы для создания постоянных концентраций анализа было проведено десять циклов экстракции в статическом режиме, который заключался в помещении исследуемой ХДС на 24 часа в *n*-октан в объеме 100 см³ (с обновлением октана после каждого погружения) при температурах 25, 50 и 80°C.

Анализ полученных экстрактов проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000, оснащенный пламенно-ионизационным детектором. Определение компонентов осуществляли на кварцевой капиллярной колонке FFAP 50 м×0.32 мм×0.5 мкм фирмы Agilent. Температура термостата колонок: изотерма 180°C (0 минут), нагрев до 220°C со скоростью 6°C в минуту, изотерма 40 минут. Температура испарителя 220°C. Температура детектора 250°C. Поток газа-носителя (азота) 1 см³/мин, сброс 1:50. Объем вводимой пробы 1 мм³. Количественное определение содержания анализов в экстракте проводили методом абсолютной градуировки.

Обсуждение результатов

В таблицах 1-3 представлены результаты анализа образцов *n*-октана, полученные в статическом режиме экстракции при 25, 50 и 80°C соответственно. Данные таблиц представлены на рисунках 1-4.

Из представленных данных видно, что после первой статической экстракции наблюдается значительное снижение концентрации анализа в *n*-октане, которое можно объяснить десорбцией слабо-закрепленного анализа с поверхности изготовленных ХДС. Подвижная фаза про-



Таблица 1. Результаты анализа *n*-октана после статической экстракции ЖК из ХДС при 25°C
Table 1. Analysis results *n*-octane after static extraction of FA from CDS at 25°C

№ погружения в экстракционную среду	Концентрация в исходном растворе C , мг/м ³ $\bar{x} \pm \Delta, n = 5, P = 0.95$			
	C14	C15	C16	C18
1	246±7	292±10	310±7	770±31
2	166±4	157±3	107±3	281±9
3	175±3	142±6	122±6	260±6
4	178±7	139±5	124±4	273±12
5	168±6	144±2	125±5	290±4
6	162±4	160±13	133±3	279±6
7	159±5	155±6	119±2	292±7
8	180±14	142±7	130±4	279±5
9	164±2	145±3	128±3	284±7
10	157±6	178±5	144±8	287±6

Таблица 2. Результаты анализа *n*-октана после статической экстракции ЖК из ХДС при 50°C
Table 2. Analysis results *n*-octane after static extraction of FA from CDS at 50°C

№ погружения в экстракционную среду	Концентрация в исходном растворе C , мг/м ³ $\bar{x} \pm \Delta, n = 5, P = 0.95$			
	C14	C15	C16	C18
1	609±7	617±10	731±7	1648±31
2	400±4	338±3	312±3	675±9
3	393±3	331±6	283±6	625±6
4	396±7	318±5	284±4	632±12
5	388±6	328±2	276±5	633±4
6	377±4	335±13	302±3	620±6
7	380±5	330±6	283±2	640±7
8	382±14	322±7	297±4	641±5
9	370±2	334±3	296±3	640±7
10	372±6	348±5	291±8	634±6

Таблица 3. Результаты анализа *n*-октана после статической экстракции ЖК из ХДС при 80°C
Table 3. Analysis results *n*-octane after static extraction of FA from CDS at 80°C

№ погружения в экстракционную среду	Концентрация в исходном растворе C , мг/м ³ $\bar{x} \pm \Delta, n = 5, P = 0.95$			
	C14	C15	C16	C18
1	805±7	967±10	997±7	2655±31
2	543±4	534±3	427±3	960±9
3	536±3	497±6	401±6	913±6
4	538±7	499±5	402±4	936±12
5	527±6	501±2	410±5	941±4
6	545±4	508±13	410±3	940±6
7	539±5	516±6	422±2	947±7
8	570±14	514±7	416±4	938±5
9	552±2	503±3	403±3	934±7
10	551±6	523±5	433±8	936±6

никает в поры, присутствующие в полимерной матрице, и полностью заполняет

их за короткий промежуток времени. При этом достигается максимальная площадь

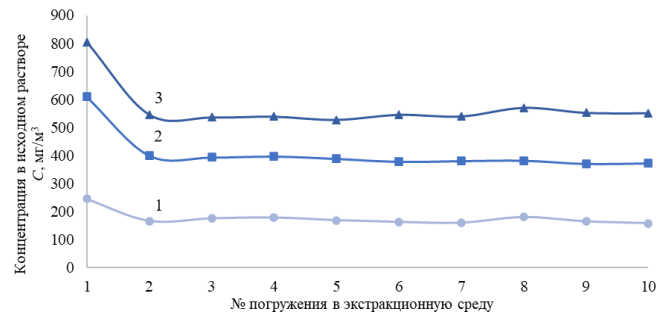


Рис 1. Зависимость концентрации тетрадекановой кислоты в *n*-октаноле от цикла статической экстракции при температурах 25 (1), 50(2) и 80°C (3)

Fig 1. The dependence of the concentration of tetradecanoic acid in *n*-octane from the static extraction cycle at temperatures of 25 (1), 50 (2), and 80°C (3)

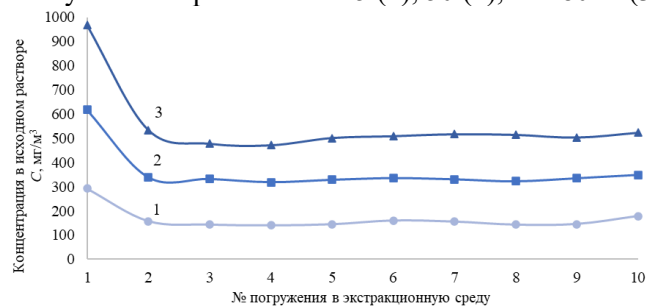


Рис 2. Зависимость концентрации пентадекановой кислоты в *n*-октаноле от цикла статической экстракции при температурах 25 (1), 50 (2) и 80°C (3)

Fig 2. The dependence of the concentration of pentadecanoic acid in *n*-octane from the static extraction cycle at temperatures of 25 (1), 50 (2), and 80°C (3)

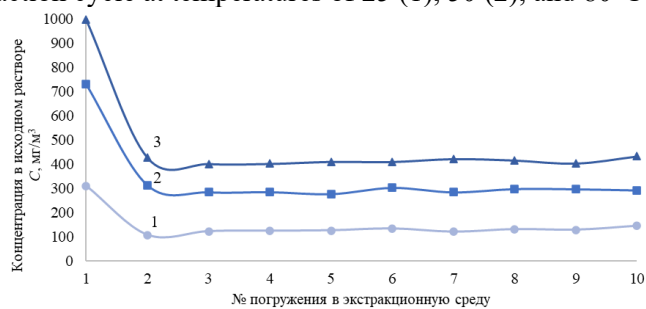


Рис 3. Зависимость концентрации гексадекановой кислоты в *n*-октаноле от цикла статической экстракции при температурах 25 (1), 50 (2) и 80°C (3)

Fig 3. The dependence of the concentration of hexadecanoic acid in *n*-octane from the static extraction cycle at temperatures of 25 (1), 50 (2), and 80°C (3)

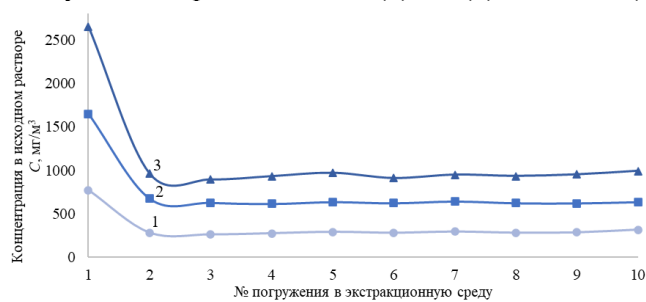


Рис 4. Зависимость концентрации октадекановой кислоты в *n*-октаноле от цикла статической экстракции при температурах 25 (1), 50 (2) и 80°C (3)

Fig 4. The dependence of the concentration of octadecanoic acid in *n*-octane from the static extraction cycle at temperatures of 25 (1), 50 (2), and 80°C (3)

контакта между аналитами и экстрагентом. После заполнения пор молекулами растворителя ЖК, находящиеся на поверхности пор полимерной матрицы, начинают диффундировать в *n*-октан, имея самый короткий путь диффузии и самую высокую скорость высвобождения. Растворимость и коэффициент диффузии для четырех исследуемых ЖК различны из-за отличий в длине углеводородного радикала и размера молекулы, поэтому концентрации этих аналитов в растворах различаются между собой.

Все исследуемые в рамках этого эксперимента образцы, начиная со второго и всех последующих погружениях в экстракционную среду, производят десорбцию аналитов в близких количествах

Как видно из представленных рисунков, повышение температуры экстрагента увеличивает растворимость аналита и коэффициента диффузии, приводит к ослаблению взаимодействий между молекулами аналита и монолитной матрицей, снижает вязкость и поверхностное натяжение растворителя, что улучшает его проникновение в поры и пространство между матричными частицами.

Сопоставляя результаты экспериментов, полученных при исследовании монолитных ХДС при температурах 25 и 50°C, 25 и 80°C, наблюдается увеличение содержания ЖК в экстрактах более чем в 2 и 3 раза соответственно. Из представленных данных становится ясно, что увеличение температуры статической экстракции одновременно повышает содержание ЖК в растворах и уменьшает длительность получения квазистационарных концентраций ЖК в *n*-октане за счет более быстрого высвобождения анализируемых компонентов из матрицы монолитной ХДС.

По результатам анализа полученных данных можно заключить, что степень десорбции органорастворимых аналитов из исследуемых монолитных ХДС в органический растворитель не имеет четкой зависимости от длины углеводородной

цепи. Вероятнее всего, это обусловлено ограниченным числом исследованных гомологов, что не позволило сделать более целостного наблюдения. ЖК располагаются в следующем порядке увеличения содержания в *n*-октане: гексадекановая, пентадекановая, тетрадекановая, октадекановая кислоты. Можно предположить, что с ростом углеводородного радикала увеличивается сродство аналита к растворителю, поэтому десорбция идет более активно. Аномалия десорбции октадекановой кислоты может быть вызвана ростом пространственных затруднений в порах матрицы в силу увеличения размера радикала.

В результате проведенного эксперимента был сделан вывод о том, что использование монолитных ХДС, состоящих из эпоксидной смолы и нанодисперсного адсорбента с нанесенными аналитами, позволяют получать растворы *n*-октана с известным содержанием высших ЖК в режиме статической экстракции при 25, 50 и 80°C.

Заключение

Таким образом, в работе проведена сравнительная оценка степени извлечения ЖК из монолитных ХДС при различных температурах в статическом режиме экстракции. Показано, что в десяти циклах статической экстракции *n*-октаном для всех исследованных аналитов наблюдается постоянство получаемых концентраций с погрешностью не превышающей 10%.

Однозначной зависимости степени десорбции от длины углеводородного радикала установить не удалось, однако можно предположить, что с увеличением числа атомов углерода в цепи будет расти сродство молекул аналита и растворителя, что должно способствовать облегчению процесса перехода в жидкую фазу, но лишь до тех пор, пока размер молекулы не станет создавать пространственных затруднений для движения в порах матрицы.



Установлено, что повышение температуры экстракции ожидаемо, приводит к увеличению содержания ЖК в растворах *n*-октана и уменьшает длительность получения квазистационарных концентраций. Полученные результаты могут быть использованы для создания растворов с известным содержанием целевого вещества статическим способом.

Список литературы

1. ГОСТ Р ИСО 6142-2008 Анализ газов. Приготовление градуировочных газовых смесей. Гравиметрический метод. М. Стандартинформ. 2008. 35 с.
2. ГОСТ Р ИСО 6144-2008 Анализ газов. Приготовление градуировочных газовых смесей. Статический объемный метод. М. Стандартинформ. 2008. 27 с.
3. Slominska M., Konieczka P., Namiesnik J. Standard gas mixtures – indispensable reference materials in the analysis of gaseous media // *Trends Anal. Chem.* 2010. Vol. 29, no 5. P. 419-429.
4. Slominska M., Konieczka P., Namiesnik J. New developments in preparation and use of standard gas mixtures // *Trends Anal. Chem.* 2014. Vol. 62. P. 135-143.
5. Fijalo C., Dymerski T., Gebicki J., Namiesnik J. Devices for the Production of Reference Gas Mixtures // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2016. Vol. 46, № 5. P. 361-373.
6. Платонов И.А., Родинков О.В., Горбачева А.В., Москвин Л.Н., Колесниченко И.Н. Методы и средства приготовления стандартных газовых смесей // *Журнал аналитической химии.* 2018. Т. 73, № 2. С. 83-105.
7. Naganowska-Nowak A., Konieczka P., Przyjazny A., Namiesnik J. Development of techniques of generation of gaseous standard mixtures // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2005. Vol. 35, no 1. P. 31-35.
8. Gameson L., Rhoderick G.C., Guenther F.R. Preparation of accurate, low-concentration gas cylinder standards by cryogenic trapping of a permeation tube gas stream // *Anal. Chem.* 2012. Vol. 84. P. 2857-2861.

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.

9. Березкин В.Г., Платонов И.А., Лепский М.В., Исмагилов Д.Р., Онучак Л.А. Использование межфазного равновесия в системе газ-нелетучая жидкость для получения газового потока, содержащего микроконцентрации летучих соединений // *Журн. физ. химии.* 2003. Т. 77, № 7. С. 1341-1344.
10. Лепский М.В., Платонов И.А., Кудряшов С.Ю., Березкин В.Г., Исмагилов Д.Р., Онучак Л.А. Теоретическое и экспериментальное изучение поведения системы последовательно соединенных барботеров с целью получения газового потока, содержащего стационарные концентрации летучих веществ // *Изв. ВУЗов. Химия и хим. технология.* 2004. Т. 47, № 9. С. 138-143.
11. Березкин В.Г., Платонов И.А., Онучак Л.А., Лепский М.В. Патент РФ. № 2213958, 2003.
12. Москвин Л.Н., Родинков О.В., Катрузов А.Н. Хроматомембранный метод разделения веществ и его аналитические возможности // *Журн. аналит. химии.* 1996. Т. 51, № 8. С. 835-838.
13. Москвин Л.Н., Родинков О.В. Поверхностно-слоиные композиционные сорбенты для экспрессного концентрирования летучих органических веществ из водных и газовых сред // *Журн. аналит. химии.* 2012. Т. 67, № 10. С. 908-916.
14. Москвин Л.Н., Родинков О.В. Хроматомембранные методы: физико-химические принципы, аналитические и технологические возможности // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2012. № 4. С. 719-736.
15. Платонов И.А., Колесниченко И.Н., Новикова Е.А., Муханова И.М. По-



лучение газовых смесей известного состава динамическими методами // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2017. Т. 17, № 3. С. 378-387.

16. Kubín M., Špaček P., Chromeček R. Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate) // *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1967. Vol. 32. P. 3881-3887.

17. Ross W.D., Jefferson R.T. In Situ-Formed Open-Pore Polyurethane as Chromatography Supports // *Journal of Chromatographic Science*. 1970. Vol. 8, no 7. P. 386-389.

18. Schnecko H., Bieber O. Foam filled columns in gas chromatography // *Chromatographia*. 1971. Vol. 4, no 3. P. 109-112.

19. Ross W.D., Hileman F.D., Sievers R.E., Hess G.G. In situ preparation and evaluation of open pore polyurethane chromatographic columns // *Analytical Chemistry*. 1973. Vol. 45, no 7. P. 1126-113.

20. Dandeneau R.D., Zerenner E.H. An investigation of glasses for capillary chromatography // *Journal of High Resolution Chromatography*. 1979. Vol. 2, no 6. P. 351-356.

21. Noel R., Sanderson A., Spark L. A Monolithic Ion-Exchange Material Suitable for Downstream Processing of Bioproducts // *Cellulosics: Materials for Selective Separations and Other Technologies*. 1993, P. 17-24.

22. Svec F. Monolithic columns: A historical overview // *Electrophoresis*. 2017. Vol. 38, no 22-23. P. 2810-2820.

23. Belenkii B.G. High-performance liquid chromatography of proteins on short capillary columns // *Journal of High Resolution Chromatography*. 1990. Vol. 13, no 3. P. 185-189.

24. Belenkii B.G. High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation // *Journal of Liquid Chromatography*. 1990. Vol. 13, no 1. P. 63-70.

25. Tennikova T.B. High-performance membrane chromatography of proteins, a novel method of protein separation // *Journal of Chromatography A*. 1991. Vol. 555, no 1-2. P. 97-107.

26. Svec F., Frechet J.M.J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media // *Analytical Chemistry*. 1992. Vol. 64, no 7. P. 820-822.

27. Liang Y., Zhang L., Zhang Y. Recent advances in monolithic columns for protein and peptide separation by capillary liquid chromatography // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. Vol. 405, no 7. P. 2095-2106.

28. Eeltink S., Wouters S., Dores-Sousa J.L., Svec F. Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides, and peptides // *Journal of Chromatography A*. 2016. Vol. 1498. P. 8-21.

29. Канатьева А.Ю., Курганов А.А., Викторова Е.Н., Королёв А.А. Монолитные стационарные фазы в жидкостной и газовой хроматографии // *Успехи химии*. 2008. Т. 77, № 4. С. 393-400.

30. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии. М. Высшая школа. 2004. ч.1. 361 с.

References

1. GOST R ISO 6142-2008 Analiz gazov. Prigotovlenie graduirovocnyh gazovyh smesey. Gravimetricheskij metod. M, Standartinform, 2008, 35 p.

2. GOST R ISO 6144-2008 Analiz gazov. Prigotovlenie graduirovocnyh gazovyh smesey. Sticheseskij ob'emnyj metod. M., Standartinform, 2008, 27 p.

3. Slominska M., Konieczka P., Namiesnik J. Standard gas mixtures – indispensable reference materials in the analysis of gaseous media, *Trends Anal. Chem.* 2010; 29(5): 419-429. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.02.003>

4. Slominska M., Konieczka P., Namiesnik J. New developments in preparation and use of standard gas mixtures. *Trends Anal. Chem.* 2014; 62: 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.013>



5. Fijalo C., Dymerski T., Gebicki J., Namiesnik J. Devices for the Production of Reference Gas Mixtures. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2016; 46(5): 361-373. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.953672>
6. Platonov I.A., Rodinkov O.V., Gorbacheva A.V., Moskvina L.N., Kolesnichenko I.N. Methods and devices for the preparation of standard gas mixtures. *J. of analytical chemistry.* 2018; 73(2): 109-127. <https://doi.org/10.1134/S1061934818020090>
7. Naganowska-Nowak A., Konieczka P., Przyjazny A., Namiesnik J. Development of techniques of generation of gaseous standard mixtures. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2005; 35(1): 31-35. <https://doi.org/10.1080/10408340590947916>
8. Gameson L., Rhoderick G.C., Guenther F.R. Preparation of accurate, low-concentration gas cylinder standards by cryogenic trapping of a permeation tube gas stream. *Anal. Chem.* 2012; 84: 2857-2861. <https://doi.org/10.1021/ac203392w>
9. Berezkin V.G., Platonov I.A., Lepsky M.V., Ismagilov D.R., Onuchak L.A. Use of the interfacial equilibrium in a gas-nonvolatile liquid system for the preparation of a gas flow containing trace amounts of volatile compounds. *Russian journal of physical chemistry A.* 2003; 77(7): 1204-1206.
10. Lepsky M.V., Platonov I.A., Kudryashov S.Yu., Berezkin V.G., Ismagilov D.R., Onuchak L.A. Teoreticheskoe i eksperimental'noe izuchenie povedeniya sistemy posledovatel'no soedinyemykh barboterov s tsel'yu polucheniya gazovogo potoka, soderzhashchego stacionarnye kontsentratsii letuchikh veshchestv. *Chemchemtech.* 2004; 47(9): 138-143.
11. Berezkin V.G., Platonov I.A., Onuchak L.A., Lepsky M.V. Patent RF, no. 2213958, 2003.
12. Moskvina L.N., Rodinkov O.V., Katruzov A.N. Khromatomembrannyyi metod razdeleniya veshchestv i ego analiticheskie vozmozhnosti. *J. of analytical chemistry.* 1996; 51(8): 835-838. (In Russ.)
13. Moskvina L.N., Rodinkov O.V. *Surface-layer composite sorbents for the rapid preconcentration of volatile organic substances from aqueous solutions and gas atmospheres, J. Analyt. Chem.* 2012; 67(10): 814-822. <https://doi.org/10.1134/S1061934812100073>
14. Moskvina L.N., Rodinkov O.V. Chromatomembrane methods: physicochemical principles, analytical and technological possibilities. *Russ. Bull. Chem. Int. Ed.* 2012; 4: 723-740. <https://doi.org/10.1007/s11172-012-0105-7>
15. Platonov I.A., Kolesnichenko I.N., Novikova E.A., Mukhanova I.M. Poluchenie gazovykh smesei izvestnogo sostava dinamicheskimi metodami. *Sorbtionnyye i Khromatograficheskie Protssy.* 2017; 17(3): 378-387. <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2017.17/391> (In Russ.)
16. Kubín M., Špaček P., Chromeček R. Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications.* 1967; 32: 3881-3887. <https://doi.org/10.1135/cccc19673881>
17. Ross W.D., Jefferson R.T. In Situ-Formed Open-Pore Polyurethane as Chromatography Supports. *Journal of Chromatographic Science.* 1970; 8(7): 386-389. <https://doi.org/10.1093/chromsci/8.7.386>
18. Schnecko H., Bieber O. Foam filled columns in gas chromatography. *Chromatographia.* 1971; 4(3): 109-112. <https://doi.org/10.1007/BF02311199>
19. Ross W.D., Hileman F.D., Sievers R.E., Hess G.G. In situ preparation and evaluation of open pore polyurethane chromatographic columns. *Analytical Chemistry.* 1973; 45(7): 1126-113. <https://doi.org/10.1021/ac60329a029>
20. Dandeneau R.D., Zerenner E.H. An investigation of glasses for capillary chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography.* 1979; 2(6): 351-356. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240020617>
21. Noel R., Sanderson A., Spark L. *A Monolithic Ion-Exchange Material Suitable for Downstream Processing of Bioproducts.*



Cellulosics: Materials for Selective Separations and Other Technologies. 1993; 17-24.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-2864-3_30

22. Svec F. Monolithic columns: A historical overview. *Electrophoresis*. 2017; 38(22-23): 2810-2820.

<https://doi.org/10.1002/elps.201700181>

23. Belenkii B.G. High-performance liquid chromatography of proteins on short capillary columns. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1990; 13(3): 185-189.

<https://doi.org/10.1002/jhrc.1240130310>

24. Belenkii B.G. High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation. *Journal of Liquid Chromatography*. 1990; 13(1): 63-70.

<https://doi.org/10.1080/01483919008051787>

25. Tennikova T.B. High-performance membrane chromatography of proteins, a novel method of protein separation. *Journal of Chromatography A*. 1991; 555(1-2): 97-107.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)87170-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)87170-3)

26. Svec F., Frechet J.M.J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry*. 1992; 64(7):

820-822.

<https://doi.org/10.1021/ac00031a022>

27. Liang Y., Zhang L., Zhang Y. Recent advances in monolithic columns for protein and peptide separation by capillary liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012; 405(7): 2095-2106.

<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6570-x>

28. Eeltink S., Wouters S., Dores-Sousa J.L., Svec F. Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides, and peptides. *Journal of Chromatography A*. 2016; 1498: 8-21.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.002>

29. Kanatieva A.Yu., Kurganov A.A., Viktorova E.N., Korolev A.A. Monolithic stationary phases in liquid and gas chromatography. *Russian chemical reviews*. 2008; 77(4): 373-379.

<https://doi.org/10.1070/RC2008v077n04ABEH003754>

30. Zolotov Yu.A. Osnovy analiticheskoi khimii. M., Vysshaya shkola Publ. 2004, pt. 1, 361 p.

Информация об авторах / Information about the authors

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

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

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

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

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

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

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

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

Статья поступила в редакцию 17.01.2023; одобрена после рецензирования 14.02.2023; принята к публикации 15.02.2023.

The article was submitted 17.01.2023; approved after reviewing 14.02.2023; accepted for publication 15.02.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723.2:544.32

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11141

Особенности определения энтальпии сорбции антоцианов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

Виктор Иванович Дейнека^{1✉}, Андрей Николаевич Чулков²,
Елена Юрьевна Олейниц¹, Иван Станиславович Пронин¹,
Ирина Петровна Блинова¹, Ирина Ивановна Тыняная¹,
Ярослава Юрьевна Саласина¹, Владимир Федорович Селеменев³

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, deineka@bsu.edu.ru✉

²Белгородское отделение Центра оценки качества зерна, Белгород, Россия

³Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. Определены изменения термодинамических параметров переноса некоторых антоцианов из подвижной фазы на стационарную по упрощенному способу. Исследования проводили в условиях обращенно-фазовой хроматографии на колонке марки Symmetry C18 в подвижной фазе, содержащей 8 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Ранее было установлено, что удерживание антоцианов зависит от давления на входе в хроматографическую колонку, поэтому для получения правильных результатов при смене температуры необходимо изменять скорость подачи подвижной фазы для достижения того же давления. При этом получаемые параметры не зависят от того, при каком давлении на входе в колонку они были получены. Поэтому в предлагаемом в настоящей работе упрощенном (более быстром) способе измерения осуществляются только при одном давлении на входе в колонку. Однозначно определяемые из экспериментальных данных энтальпии переноса 3-глюкозидов шести основных природных антоцианидинов относительно мало различаются между собой: наименьшая энтальпия найдена для пеонидин-3-глюкозида (-27.9 ± 0.3 кДж/моль), а наибольшая – для дельфинидин-3-глюкозида (-33.1 ± 0.3 кДж/моль), при этом закономерности изменения этого параметра при добавлении гидрокси- или метокси- групп не являются отчетливо выраженными. Изменение энтропии, $\Delta\Delta S^\circ$ параметров для пеларгонидин-3-глюкозида показало, что для антоцианов наблюдается энтальпийно-энтропийная компенсация, объясняющая трудности выяснения влияния добавляемых функциональных групп на термодинамические параметры. Для исключения эффекта указанной компенсации предлагается рассчитывать $\Delta\Delta G^\circ$, как параметра, рассчитываемого по разности (для удаления параметра, зависящего от фазового соотношения) натуральных логарифмов факторов удерживания анализируемого вещества и вещества сравнения – пеларгонидин-3-глюкозида. Как и следовало предполагать, в этом случае добавление гидрофильных гидрокси-групп приводит (с учетом знака) к росту относительное изменение изобарно-изотермического потенциала $\Delta\Delta G^\circ$ на ~ 1.7 кДж/моль на одну группу, а добавление гидрофобных метокси-групп, наоборот, – к уменьшению $\Delta\Delta G^\circ$ на ~ -1.0 кДж/моль на одну группу с неплохой аддитивностью вкладов групп (± 0.1 кДж/моль). Показано также, что $\Delta\Delta G^\circ$ возрастает на 2.6 ± 0.2 кДж/моль при переходе от 3-глюкозидов к 3,5-диглюкозидам пяти антоцианидинов. Рассчитаны также изменения $\Delta\Delta G^\circ$ при усложнении углеводного радикала в положении 3.

Ключевые слова: антоцианы, термодинамические параметры удерживания, обращенно-фазовая ВЭЖХ, зависимость удерживания от давления, прямые расчеты изменения изобарно-изотермического потенциала.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

Для цитирования: Дейнека В.И., Чулков А.Н., Олейниц Е.Ю., Пронин И.С., Блинова И.П., Тыняная И.И., Саласина Я.Ю., Селеменев В.Ф. Особенности определения энтальпии сорбции антоцианов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 2. С. 171-181. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11141>



Original article

Peculiarities of the determination of the sorption enthalpy of anthocyanins under conditions of reverse-phase HPLC

Victor I. Deineka¹✉, Andrey N. Chulkov², Elena Yu. Oleinits¹,
Ivan S. Pronin¹, Irina P. Blinova¹, Irina I. Tynyanaya¹,
Yaroslava Yu. Salasina¹, Vladimir F. Selemenev³

¹Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, deineka@bsu.edu.ru✉

²Belgorod branch "Center for assessing the quality of grain and products of its processing", Belgorod, Russian Federation

³Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Abstract. Changes in the thermodynamic parameters of the transfer of some anthocyanins from the mobile phase to the stationary phase were determined using a simplified method. The studies were carried out under conditions of reversed-phase chromatography on a Symmetry C18 column in a mobile phase containing 8 vol.% acetonitrile, 10 vol.% formic acid in water. It was previously found that the retention of anthocyanins depends on the pressure at the inlet to the chromatographic column, therefore, in order to obtain the correct results with a change in temperature, it is necessary to change the flow rate of the mobile phase to achieve the same pressure. In this case, the obtained parameters do not depend on the pressure at which they were obtained at the column inlet. Therefore, in the simplified (faster) method proposed in this study, measurements were carried out only at one pressure at the column inlet. The enthalpies of transfer of 3-glucosides of six main natural anthocyanidins, unambiguously determined from experimental data insignificantly differ from each other: the lowest enthalpy was found for peonidin-3-glucoside (-27.9 ± 0.3 kJ/mol), and the highest enthalpy was determined for delphinidin-3-glucoside (-33.1 ± 0.3 kJ/mol), while the patterns of change in this parameter upon the addition of hydroxy or methoxy groups were not clearly expressed. Entropy change, $\Delta\Delta S^\circ$ parameters for pelargonidin-3-glucoside showed that enthalpy-entropy compensation is observed for anthocyanins, which explains the difficulties in elucidating the effect of added functional groups on thermodynamic parameters. For the elimination of the effect of this compensation, it was proposed to calculate $\Delta\Delta G^\circ$, as a parameter calculated by the difference (for the removal of the parameter depending on the phase ratio) of the natural logarithms of the retention factors of the analyte and the reference substance - pelargonidin-3-glucoside. As expected, in this case the addition of hydrophilic hydroxy groups leads (taking into account the sign) to an increase in $\Delta\Delta G^\circ$ by ~ 1.7 kJ/mol per group, and the addition of hydrophobic methoxy groups, on the contrary, leads to a decrease in $\Delta\Delta G^\circ$ by ~ -1.0 kJ/mol per group with good additivity of group contributions (± 0.1 kJ/mol). It was also shown that $\Delta\Delta G^\circ$ increases by 2.6 ± 0.2 kJ/mol during the transition from 3-glucosides to 3,5-diglucosides of five anthocyanidins. Changes of $\Delta\Delta G^\circ$ for the more complex carbohydrate radical in position 3 were also calculated.

Keywords: anthocyanins, thermodynamic retention parameters, reverse phase HPLC, dependence of the retention on pressure, direct calculations of change in isobaric isothermal potential.

Acknowledgments: this work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state order for universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project no. FZGU-2023-0009

For citation: Deineka V.I., Chulkov A.N., Oleinits E.Yu., Pronin I.S., Blinova I.P., Tynyanaya I.I., Salasina Ya.Yu, Selemenev V.F. Peculiarities of the determination of the sorption enthalpy of anthocyanins under conditions of reverse-phase HPLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 171-181. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11141>

Введение

Удерживание веществ в хроматографии и их разделение зависит от энергии их взаимодействия со стационарной фазой и с компонентами подвижной фазы. Анализ устанавливающегося равновесия между двумя фазами необходим для

обоснования теоретических моделей удерживания в хроматографии [1, 2]. К числу важных направлений такого анализа удерживания относят определение термодинамических характеристик переноса веществ с подвижной фазы на стационарную, для чего традиционно используют уравнение Вант Гоффа [3]:



$$\ln k(i) = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \varphi, (1)$$

где $k(i)$ – фактор удерживания сорбата i , ΔH^0 – изменение энтальпии переноса сорбата i из подвижной фазы на стационарную, ΔS^0 – изменение энтропии этого же процесса, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, φ – фазовое соотношение колонки. При этом для расчета фактора удерживания необходимо определение t_0 , рассматриваемое как время удерживания не сорбируемого компонента:

$$k(i) = \frac{t_R(i) - t_0}{t_0}, (2)$$

где $t_R(i)$ – время удерживания сорбата i .

Простые и хорошо известные уравнения (1) и (2) на самом деле не столь тривиальны. Так, ΔH^0 – физико-химический параметр, измеряемый по определению при некотором постоянном давлении [4]. В колоночной хроматографии при измерении времени удерживания давление на входе в колонку всегда отличается от давления на выходе, что необходимо для перемещения подвижной фазы. Но вследствие низкой сжимаемости жидкостей в жидкостной хроматографии это различие не принципиально. Тем не менее в ряде работ было установлено, что реально фактор удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ зависит от давления на входе в колонку [5] не только для полимерных и олигомерных соединений, но и для молекул небольшого размера. Некоторые причины, приводящие к этому эффекту, обсуждены в работе [6]. Более того, в работе [7] нелинейность в графике Вант Гоффа в широком диапазоне температур связывают с возможными конформационными изменениями в стационарной C18-фазе при изменении температуры, вследствие чего величины «мертвого» объема могут быть различными для веществ различного строения.

Зависимость удерживания антоцианов от давления в условиях обращенно-фазовой хроматографии на «мономерной» C18-фазе была установлена в работе [8].

В этой работе было найдено, что натуральный логарифм фактора удерживания сорбата при постоянной температуре и относительно небольших давлениях (менее 200 бар) может быть аппроксимирован квадратичным уравнением:

$$\ln k(i) = b_0 + b_1 \cdot P + b_2 \cdot P^2, (3)$$

где P – давление (избыточное) на входе в колонку.

Использование этого уравнения позволило рассчитать логарифмы факторов удерживания сорбатов при различных температурах, но при одинаковых расчетных давлениях на входе в колонку. Изменения энтальпий, рассчитанные при постоянных скоростях подвижной фазы, для каждого из 3-глюкозидов шести обычных природных антоцианидинов (дельфинидина, цианидина, пегунидина, пеларгонидина, пеонидина и мальвидина) различались на ~10%. Так, ΔH^0 рассчитанные при скоростях 0.8 и 0.2 см³/мин, например, для мальвидин-3-глюкозида составили -26.9 и -23.7 кДж/моль, соответственно. Но при расчете при одинаковых давлениях (либо 0, либо 50, либо 100 бар) для мальвидин-3-глюкозида получили очень близкие результаты (например, -22.3, -22.2 и -21.9 кДж/моль, соответственно).

Наличие логарифма фазового соотношения в уравнении (1) не позволяет рассчитать изменение энтропии для каждого из соединений. Оценка фазового соотношения по доле углерода в используемом сорбенте [9] не может быть признанной корректной, поскольку, во-первых, привитой слой не эквивалентен жидкой фазе алканов вследствие неплотной прививки на поверхности силикагеля. Даже при максимальной степени дериватизации силикагеля плотность прививки силанольных групп примерно вдвое меньше, чем упаковка n -алканов в твердом состоянии [10]. Во-вторых, плотность прививки алкильных групп на поверхности C18-сорбентов может быть различной, и удерживание при этом изменяется [11]. Но можно вследствие вычитания $\ln \varphi$ оценить

изменение как энтропии, $\Delta\Delta S^0(i \rightarrow j)$, так и энтальпии, $\Delta\Delta H^0(i \rightarrow j)$, относительно вещества, принятого в качестве вещества сравнения.

Второе уравнение предполагает использование t_0 , но вопрос определения «мертвого» времени [12] очень сложный, и этот параметр зависит от механизма удерживания сорбатов. Так для веществ, проникающих в привитую фазу, использование времени удерживания несорбируемого компонента не приемлемо.

Таким образом, расчет энтальпии переноса сорбатов из подвижной фазы на стационарную по традиционной схеме (при постоянной скорости подвижной фазы без учета давления на входе в колонку) может привести к ошибочным результатам. Но способ определения термодинамических параметров, использованный в работе [8] время затратный, поэтому цель настоящего исследования - разработка более быстрого способа определения термодинамических параметров переноса антоцианов с подвижных фаз на стационарные.

Экспериментальная часть

Для сокращенного обозначения антоцианов в работе использованы буквенные обозначения: Dp – дельфинидин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксофлавилий), Cy – цианидин (3,5,7,3',4'-пентагидроксофлавилий), Pt – петунидин (3,5,7,3',4'-пентагидроксо-5'-метоксифлавилий), Pn – пеонидин (3,5,7,4'-тетрагидроксо-3'-метоксифлавилий), Mv – мальвидин (3,5,7,4'-тетрагидроксо-3',5'-диметоксифлавилий). Добавление к аббревиатуре 3Glu или 3,5diGlu обозначает 3-глюкозиды или 3,5 диглюкозиды соответствующих агликонов; три 3-диглюкозида обозначены: 3Rut – 3-рутинозид, 3(6"-рамнозилглюкозид); 3Sopho – 3-софорозид, 3(2"-глюкозилглюкозид), 3Sam – 3-самбубиозид, 3(2"-ксилозилглюкозид); два 3-триглюкозида обозначены: 3GRut – 3(2"-рамнозилрутинозид); 3XRut – 3(2"-ксилозилрутинозид).

В работе использовали экстракты антоцианов из природных растительных материалов: листьев багряника канадского (*Cercis canadensis*) – как источник Dp3Glu, Cy3Glu, Pt3Glu, Pn3Glu и Mv3Glu [13], плодов барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris*) – как источника Pg3Glu [14], плодов винограда японского (*Vitis coignetiae*) – как источника 3,5-диглюкозидов [15], вишни обыкновенной (*Prunus cerasus*) – как источника Cy3Sopho и Cy3GRut [16], и черной малины (*Rubus occidentalis*) – как источника Cy3Sam и Cy3XRut [17]. Экстракты в 0.1 М водном растворе соляной кислоты хранили в морозильной камере в пластиковой посуде.

Разделение антоцианов осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. Хроматограммы записывали при 515 нм, рис. 1. В работе использовали хроматографическую колонку 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм); основная подвижная фаза 8 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Для сопоставления изменения изобарно-изотермических потенциалов переноса 3-глюкозидов антоцианидинов определяли зависимость их удерживания от концентрации ацетонитрила в двух элюентных системах: (а) 6 – 10 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде и (б) 15 – 18 об.% ацетонитрила, 0.5 об.% H_3PO_4 в воде. Объем вводимой пробы 20 мкл. Мертвое время определяли по удерживанию щавелевой кислоты. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали программой ChemStation, а расчеты выполняли в MS Excel.

Выход хроматографической системы в режим контролировали по полному совпадению двух последовательно записанных хроматограмм; это обеспечивает погрешность в определении $\ln k$ не больше 0.002. После смены температуры скорость подачи подвижной фазы снижали до достижения давления на входе в колонку, равного использованному в

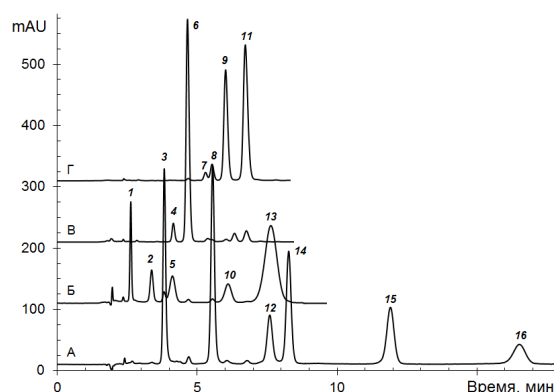


Рис. 1. Разделение антоцианов экстрактов А – листьев багрянника канадского и плодов барбариса; Б – плодов японского винограда; В – плодов вишни; Г – плодов черной малины.

Антоцианы: 1 – Dp3,5diGlu; 2 – Cy3,5diGlu; 3 – Dp3Glu; 4 – Cy3Sopho; 5 – Pt3,5diGlu; 6 – Cy3GRut; 7 – Cy3Sam; 8 – Cy3Glu; 9 – Cy3XRut; 10 – Pn3,5diGlu; 11 – Cy3Rut; 12 – Pt3Glu; 13 – Mv3,5diGlu; 14 – Pg3Glu; 15 – Pn3Glu; 16 – Mv3Glu.

Fig. 1. Separation of anthocyanins extracts А – leaves of *Cercis canadensis* and barberry fruits; Б – fruits of Japanese grapes; В – cherry fruits; Г – black raspberry fruits

Anthocyanins: 1 – Dp3,5diGlu; 2 – Cy3,5diGlu; 3 – Dp3Glu; 4 – Cy3Sopho; 5 – Pt3,5diGlu; 6 – Cy3GRut; 7 – Cy3Sam; 8 – Cy3Glu; 9 – Cy3XRut; 10 – Pn3,5diGlu; 11 – Cy3Rut; 12 – Pt3Glu; 13 – Mv3,5diGlu; 14 – Pg3Glu; 15 – Pn3Glu; 16 – Mv3Glu.

предыдущем опыте с погрешностью не более 1 бар.

Обсуждение результатов

Поскольку в работе [8] было показано, что результаты расчета термодинамических характеристик практически одинаковы при использовании данных по удерживанию антоцианов при любом постоянном давлении, то достаточно определить удерживание при всех температурах при использовании скоростей подачи подвижной фазы, обеспечивающих одинаковое давление на входе в колонку. Корректность использования щавелевой кислоты в качестве неудерживаемого соединения для определения t_0 связана с тем, что антоцианы удерживаются по поплавному механизму [18], в котором только агликон проникает в привитой слой, а гидрофильный углеводный заместитель остается на поверхности фазы.

Полученные результаты для 3-глюкозидов шести обычных природных агликонов представлены в табл. 1. В таблице использован еще один вариант сопоставления термодинамических параметров

сорбции антоцианов, корректно исключая $\ln \phi$ – разность изобарно-изотермических потенциалов с использованием вещества сравнения (Pg3Glu), $\Delta \Delta G^0$:

$$\Delta \Delta G^0(i \rightarrow j) = \Delta \Delta H^0(i \rightarrow j) - T \cdot \Delta \Delta S^0(i \rightarrow j), \quad (4)$$

где i и j – сопоставляемые вещества. Отметим, что такой расчет совпал с результатами простого быстрого способа:

$$\Delta \Delta G^0(i \rightarrow j) = RT \ln k(j) - RT \ln k(i). \quad (5)$$

По представленным в табл. 1 данным можно сделать вывод о том, что добавление метокси- и гидрокси-групп в структуру Pg3Glu почти аддитивно складывается при расчетах изменения изобарно-изотермического потенциала и соответствует порядку элюирования антоцианов: $t_R(\text{Dp3Glu}) < t_R(\text{Cy3Glu}) < t_R(\text{Pt3Glu}) < t_R(\text{Pg3Glu}) < t_R(\text{Pn3Glu}) < t_R(\text{Mv3Glu})$.

Но роста (по модулю) энтальпий переноса всех шести 3-глюкозидов с подвижной на стационарную фазу в этом же порядке не найдено. Более того, для тройки антоцианов (Dp3Glu, Cy3Glu и Pg3Glu), для которых число полярных ОН-групп в структуре кольца В уменьшается с 3 до 1,

Таблица 1. Результаты расчетов термодинамических параметров удерживания антоцианов в подвижной фазе 8 об. % ацетонитрила и 10 об. % муравьиной кислоты на колонке 150×4.6 mm Symmetry C18, 3.5 мкм при постоянном давлении на входе в колонку

Table 1. The results of calculations of the thermodynamic parameters of the retention of anthocyanins in the mobile phase of 8 vol. % acetonitrile and 10 vol. % formic acid on a 150×4.6 mm Symmetry C18, 3.5 μm column at constant column inlet pressure

№	Антоциан	ΔH^0 , кДж/моль	$\Delta\Delta H^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль	$\Delta\Delta S^0(i \rightarrow j)$, Дж/(моль·К)	$\Delta\Delta G^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль
1	Dp3Glu	-33.1±0.3**	-4.9	-27.1	3.5
2	Cy3Glu	-29.2±0.3	-1.0	-8.4	1.6
3	Pt3Glu	-29.8±0.3	-1.6	-6.7	0.5
4	Pg3Glu	-28.2±0.3	0	0	0
5	Pn3Glu	-27.9±0.3	0.3	4.5	-1.1
6	Mv3Glu	-29.0±0.3	-0.7	4.2	-2.0

Примечание: * – расчет относительно Pg3Glu; ** – погрешности определены по данным работы [5].

соответственно, при росте удерживания экзотермичность снижается. Следовательно, экспериментально найденный порядок элюирования антоцианов обеспечивается энтропийной составляющей, что заставляет вспомнить о так называемой «энтальпийно-энтропийной» компенсации.

По заместительной модели удерживания в обращенно-фазовой хроматографии наклон зависимости логарифма удерживания сорбата от логарифма молярной концентрации органического модификатора водно-органических подвижных фаз указывает на число высвобождаемых молекул органического растворителя при сорбции [19]. На картах разделения второго типа [20] логарифмы факторов удерживания всех сорбатов строятся как функции логарифма фактора удерживания вещества сравнения, R , (в нашем случае $R=Pg3Glu$) по уравнению (6).

$$\lg k(i) = a_0(i) + a_1(i) \cdot \lg k(R) \quad (6)$$

При этом получают набор прямых линий, у которых наклон, $a_1(i)$, равен отношению числа моль молекул органического модификатора, высвобождаемых при сорбции каждого из сорбатов относительно такого же параметра для вещества сравнения.

Результаты определения a_1 для пяти 3-глюкозидов относительно Pg3Glu в двух

элюентных системах, содержащих ацетонитрил, представлены в табл. 2. Для ряда Dp3Glu – Cy3Glu – Pg3Glu в элюентах, подкисленных 10 об. % муравьиной кислоты, параметры $a_1(i)$ равны 1.072–1.028–1.000, соответственно. Это указывает на рост числа молекул ацетонитрила высвобождаемых при сорбции на C18-фазе при добавлении ОН-групп в структуру антоциана. Это не обязательно указывает на повышение чисел сольватации антоцианов ацетонитрилом. Более вероятно то, что вытесняется большее число молекул ацетонитрила, заполняющих рыхлый слой привитых C18-радикалов, при проникновении в него молекул большего размера. Поскольку в этом слое имеются молекулы не только ацетонитрила, но и муравьиной кислоты, то возможна сольватация антоцианов по гидроксильным группам в привитом слое молекулами муравьиной кислоты, что обеспечивает не только повышение экзотермичности процесса сорбции, но и уменьшение энтропии антоцианов в сорбированном состоянии.

В подвижных фазах, подкисленных орто-фосфорной кислотой, наклоны прямых зависимостей на картах разделения второго типа для этих же антоцианов при добавлении ОН-групп растут еще больше, табл. 2. Это согласуется с



Таблица 2. Параметры уравнения (5) на картах разделения второго типа в двух элюентных системах: *a* – «ацетонитрил-10 об. % муравьиной кислоты-вода», и *b* – «ацетонитрил-0.5 об. % орто-фосфорно кислоты-вода»

Table 2. Parameters of equation (5) on separation maps of the second type in two eluent systems: *A* – "acetonitrile – 10 vol. % formic acid-water", and *b* – "acetonitrile – 0.5 vol. % ortho-phosphoric acid-water"

№	Антоцианы	Элюентная система <i>a</i>		Элюентная система <i>b</i>	
		<i>a</i> ₀	<i>a</i> ₁	<i>a</i> ₀	<i>a</i> ₁
1	Dp3G	-0.566	1.072	-0.585	1.139
2	Cy3G	-0.260	1.028	-0.262	1.053
3	Pt3G	-0.126	1.134	-0.141	1.129
4	Pn3G	0	1	0	1
5	Pn3G	0.148	1.089	0.128	1.072
6	Mv3G	0.258	1.188	0.225	1.152

Таблица 3. Изменение термодинамических параметров удерживания антоцианов при добавлении глюкозидного радикала к некоторым 3-глюкозидам в подвижной фазе 8 об. % ацетонитрила и 10 об. % муравьиной кислоты на колонке 150×4.6 мм Symmetry C18, 3.5 мкм при постоянном давлении на входе в колонку

Table 3. Change in the thermodynamic parameters of anthocyanin retention upon addition of a glucoside radical to some 3-glucosides in the mobile phase 8 vol. % acetonitrile and 10 vol. % formic acid on a 150×4.6 mm Symmetry C18, 3.5 μm column at constant column inlet pressure

№	Антоциан	ΔH^0 , кДж/моль	$\Delta\Delta H^{0*}(i \rightarrow j)$, кДж/моль	$\Delta\Delta S^0(i \rightarrow j)$, кДж/(моль·К)	$\Delta\Delta G^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль
1	Cy3Glu	-29.2 ± 0.3	0	0	0
2	Cy3,5diGlu	-30.7 ± 0.3	-1.5	-13.3	2.8
3	Pt3Glu	-29.8 ± 0.3	0	0	0
4	Pt3,5diGlu	-29.7 ± 0.3	0.1	-8.5	2.8
5	Pn3Glu	-27.9 ± 0.3	0	0	0
6	Pn3,5diGlu	-26.4 ± 0.3	1.6	-2.6	2.4
7	Mv3Glu	-29.0 ± 0.3	0	0	0
8	Mv3,5diGlu	-26.6 ± 0.3	2.3	-0.7	2.5

Примечание * – расчет относительно Pg3Glu; ** – погрешности определены по данным работы [5].

тем, что в привитом слое уже нет муравьиной кислоты, и пустоты заполняются только молекулами ацетонитрила, поэтому и вытесняется большее число этих молекул.

Повышение липофильности (и роста удерживания антоцианов) при добавлении метокси-группы в структуру антоцианов (переход в ряду Pg3Glu → Pn3Glu → Mv3Glu) приводит к немонотонному изменению энтальпии и энтропии и предсказание или объяснение их изменения проблематично.

В табл. 3 приведены результаты определения изменения термодинамических параметров удерживания антоцианов при

добавлении глюкозидного радикала в положение 5 для четырех 3-глюкозидов.

Для всех четырех случаев, представленных в табл. 3, изменение энергии Гиббса – положительное и примерно одинаковое (от 2.4 до 2.8 кДж/моль), что указывает, во-первых, на падение удерживания при таком изменении структуры, определенное как важная закономерность в работе [21]. Во-вторых, это свидетельствует об эффективности инкрементной модели (уравнение 7) в этом случае.

$$\lg k(X3,5diGlu) \approx \lg k(X3Glu) + \Delta(5Glu). \quad (7)$$

Но относительно $\Delta\Delta H^0$ и $\Delta\Delta S^0$ для всех пар антоцианов наблюдаются заметные

Таблица 4. Изменение термодинамических параметров удерживания антоцианов при добавлении гликозидных радикалов к имеющемуся гликозидному радикалу в Cy3Glu
 Table 4. Changes in the thermodynamic parameters of anthocyanin retention upon addition of glycosidic radicals to the existing glycosidic radical in Cy3Glu

№	Тип гликозидов	Антоциан	ΔH^0 , кДж/моль	$\Delta\Delta H^{0*}(i \rightarrow j)$, кДж/моль	$\Delta\Delta S^0(i \rightarrow j)$, Дж/(моль·К)	$\Delta\Delta G^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль
1	моногликозид	Cy3Glu	-29.2	0	0	0
2	диглюкозиды	Cy3Sopho	-31.3	-2.1	-11.3	1.5
3		Cy3Sam	-30.3	-1	-4.5	0.4
4		Cy3Rut	-30.7	-1.4	-2.6	-0.6
5	триглюкозиды	Cy3GRut	-31.6	-2.3	-10.9	1.1
6		Cy3XRut	-30	-0.8	-2.7	0

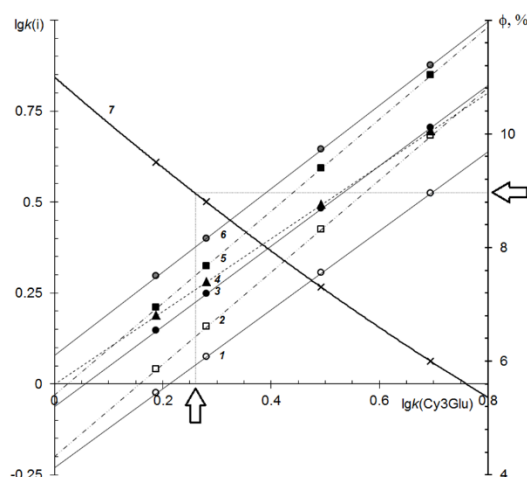


Рис. 2. Карта разделения второго типа для 6 антоцианов в элюентной системе «ацетонитрил – 10 об.% муравьиной кислоты – вода».

Антоцианы: 1 – Cy3Sopho; 2 – Cy3GRut; 3 – Cy3Sam; 4 – Cy3Glu; 5 – CyXRut; 6 – Cy3Rut. 7 – линия для зависимости объемной доли ацетонитрила от $lgk(Cy3Glu)$

Fig. 2. Separation map of the second type for 6 anthocyanins in the eluent system "acetonitrile - 10 vol.% formic acid - water".

Anthocyanins: 1 – Cy3Sopho; 2 – Cy3GRut; 3 – Cy3Sam; 4 – Cy3Glu; 5 – CyXRut; 6 – Cy3Rut. 7 – line for the dependence of the volume fraction of acetonitrile on $lgk(Cy3Glu)$.

различия, которые нивелируются энтропийно-энтальпийной компенсацией [22].

При прибавлении как второго, так и третьего углевода к гликозидному радикалу в положении 3 цианидина изменение энтальпии немного растет (по модулю), но удерживание производных цианидина определяется также и энтропийной составляющей, табл. 4.

Энтальпийно-энтропийная компенсация - важное свойство хроматографического поведения антоцианов в условиях обращенно-фазовой хроматографии, ко-

торое зависит от концентрации органического компонента в водно-органических подвижных фазах. Поэтому на самом деле имеет смысл анализировать термодинамические параметры сорбции веществ для чисто водных растворов (для выбранной стационарной фазы). Но экспериментальное получение данных о $\Delta G^0(i)$, практически не доступно, в первую очередь, вследствие коллапса фаз при высоком содержании воды [23]. Использование процедуры аппроксимации на нулевую концентрацию органического



модификатора было предложено Р. Калижаном [24] для нахождения $\lg k_{aq}$ – как свойства, коррелирующего с независимо определяемым параметром липофильности – экспериментальным, LOGP, или расчетным, CLOGP.

При добавлении органического модификатора в подвижную фазу удерживание падает, что связано с усилением сольватации сорбатов в подвижной фазе. Возможно и изменение состояния сорбата в сорбированном состоянии, хотя основной тип взаимодействий для этой фазы – дисперсионные взаимодействия, которые могут быть дополнены в некоторых случаях образованием водородных связей с остаточными силанольными группами [25]. Анализ изменения энтропии и энтальпии становится в значительной мере сложным и запутанным. Но знание энтальпии имеет большое значение при оптимизации разделения сорбатов за счет изменения температуры [26].

Анализ хроматографического поведения по наклонам линий трендов на картах разделения второго рода по уравнениям (5) обеспечивает простой и быстрый способ предсказания не только удерживания при заданном составе подвижной фазы, но и возможных изменений в порядке элюирования сложных смесей сорбатов во всем приемлемом (по величине $\lg k$)

Список литературы/References

1. Miyabe K. Thermodynamic Interpretation of Retention Equilibrium in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Sci.* 2009; 25(2): 219-220. <https://doi.org/10.1021/ac0202233>
2. Saifutdinov B.R., Buryak A.K. Thermodynamics of the Adsorption of Isomeric Dipyridyls and Their Derivatives from Water–Organic Solutions on HYPERCARB™ Porous Graphitic Carbon. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2019; 93(9): 1796-1803. <https://doi.org/10.1134/S0036024419090218>
3. Cole L.A., Dorsey J.G. Temperature Dependence of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. 1. Stationary-

диапазоне составов подвижных фаз. Для этого к карте разделения добавляется еще одна линия (уже не прямая) – например, обратная обычной зависимость объемной доли органического модификатора от удерживания реперного соединения, $\lg k(R)$, рис. 2.

Заключение

Таким образом, в работе предложен способ определения энтальпии переноса антоцианов с подвижной на стационарную фазу, учитывающий известную зависимость удерживания от давления на входе в колонку. Показано, что анализ зависимости энтальпии от строения антоцианов осложняется энтальпийно-энтропийной компенсацией. При этом изменения изобарно-изотермического потенциала удобнее использовать при установлении закономерностей сорбции, а изменения энтальпии необходимы для оптимизации разделения за счет изменения температуры.

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.

- Phase Considerations. *Anal. Chem.* 1992; 64(13): 1317-1323. <https://doi.org/10.1021/ac00037a004>
4. Calvert J.G. Glossary of atmospheric chemical terms. *Pure Appl. Chem.* 1990; 62(11): 2167-2219. <https://doi.org/10.1351/pac199062112167>
 5. Fekete S., Veuthey J.-L., McCalley D.V., Guillaume D. The effect of pressure and mobile phase velocity on the retention properties of small analytes and large biomolecules in ultra-high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2012; 1270: 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.056>
 6. Martin M., Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. *J.*



- Chromatogr. A.* 2005; 1090: 16-38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.005>
7. Chester T.L., Coym J.W. Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy. *J. Chromatogr. A.* 2003; 1003: 101-111. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00846-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00846-x)
8. Deineka V.I., Makarevich S.L., Blinova I.P., Deineka L.A. Determining the enthalpy of the transfer of anthocyanidins from the mobile phase to the stationary phase during reversed-phase chromatography on a C18 stationary phase. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2022; 22(4): 386-392. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10565> (In Russ.)
9. Sentell K.B., Dorsey J.G. On the Calculation of the Stationary Phase Volume in Reversed Phase Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 1988; 11(9-10): 1875-1885. <https://doi.org/10.1080/01483918808069031>
10. Deineka V.I., Nguyen Anh Van, Deineka L.A. Model of a Reversed Phase Grafted on Silica Gel. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2019; 93(12): 2490-2493. <https://doi.org/10.1134/S0036024419120057>
11. Cole L.A., Dorsey J.G. Temperature Dependence of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. 1. Stationary-Phase Considerations. *Anal. Chem.* 1992; 64(13): 1317-1323. <https://doi.org/10.1021/ac00037a004>
12. Krstulović A.M., Colin H., Guiochon G. Comparison of Methods Used for the Determination of Void Volume in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 1982; 54(14): 2438-2443. <https://doi.org/doi.org/10.1021/ac00251a009>
13. Doronin A., Deineka V., Deineka L., Tretiakov M., Tokhtar V., Andrey C. Peculiarities of Use of Bentonite Clay at Solid-Phase Purification of Anthocyanins and Flavonoids from Leaves of Plants // *Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019).* *Adv. Biol. Sci. Res.* 2019. 7; 90-93. <https://doi.org/doi.org/10.2991/isils-19.2019.21>
14. Sorokopudov V.N., Khlebnikov V.A., Deineka V.I. Antociany nekotoryh rastenij semejstva *Berberidaceae*. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja.* 2005; 4: 57-60. (In Russ.)
15. Kim M.J., Paramanatham A., Lee W.S., Yun J.W., Chang S.Hwan., Kim D.C., Park H.S., Choi Y.H., Kim G.S., Ryu C.H., Shin S.C., Hong S.C. Anthocyanins Derived from *Vitis coignetiae* Pulliat Contributes Anti-Cancer Effects by Suppressing NF- κ B Pathways in Hep3B Human Hepatocellular Carcinoma Cells and In Vivo. *Molecules.* 2020; 25: 5445. <https://doi.org/10.3390/molecules25225445>
16. Sokół-Łętowska A., Kucharska A.Z., Hodun G., Gołba M. Chemical Composition of 21 Cultivars of Sour Cherry (*Prunus cerasus*) Fruit Cultivated in Poland. *Molecules.* 2020; 25: 4587. <https://doi.org/10.3390/molecules25194587>
17. Tian Q., Monica Giusti M., Stoner G.D., Schwartz S.J. Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2006; 94(3): 465-468. <https://doi.org/doi.org/10.3390/molecules25194587>
18. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I., Chulkov A.N. A Float Mechanism of Retention in Reversed-Phase Chromatography. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2015; 89(7): 1300-1304. <https://doi.org/10.1134/S0036024415070079>
19. Murakami F. Retention behaviour of benzene derivatives on bonded reversed-phase columns. *J. Chromatogr.* 1979; 178(2): 393-399. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92497-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92497-X)
20. Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Blinova I.P., Deineka L.A. Comparing Two Versions of a Separation Map in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2022; 96(8): 1768-1772. <https://doi.org/10.1134/S0036024422080076>



21. Welch C.R., Wu Q., Simon J.E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Curr. Anal Chem.* 2008; 4(2): 75-101. <https://doi.org/10.2174/157341108784587795>
22. Pan A., Kar T., Rakshit A.K., Moulik S.P. Enthalpy-Entropy Compensation (EEC) Effect: Decisive Role of Free Energy. *J. Phys. Chem. B.* 2016; 120(40): 10531-10539. <https://doi.org/doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b05890>
23. Przybyciel M., Majors R. Phase collapse in reversed-phase liquid chromatography. *LC GC North America* 2002; 20(6): 516, 520-523.
24. Kaliszan R. QSRR: quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *Chem. Rev.* 2007; 107(7): 3212-3246. <https://doi.org/10.1021/cr068412z>
25. Bocian S., Buszowski B. Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC - A contribution for a better understanding. *J. Sep Sci.* 2012; 35(10-11): 1191-200. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200055>
26. Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Kul'chenko Ya.Yu., Blinova I.P., Deineka L.A. Control of the Selectivity of Separation and the Determination of Anthocyanins of Fruits of *Vaccinium* Family Plants Using Acetonitrile-Formic Acid-Water Eluents. *J. Anal. Chem.* 2020; 75(11): 1443-1450. <https://doi.org/10.1134/S1061934820090087>

Информация об авторах / Information about the authors

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

А.Н. Чулков – главный специалист Белгородского филиала «Центр оценки качества зерна и продуктов его переработки», Белгород, Россия

Е.Ю. Олейниц – ассистент кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

И.С. Пронин – магистрант ИФХиБ, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

И.П. Блинова – доцент кафедры общей химии, кандидат химических наук, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

И.И. Тыняная – доцент кафедры общей химии, к.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Я.Ю. Саласина – старший преподаватель кафедры общей химии, к.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

В.Ф. Селемев – профессор кафедры аналитической химии, д.х.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

A.N. Chulkov – Chief Specialist of the Belgorod branch of the Center for Grain and Processed Products Quality Assessment, Belgorod, Russian Federation, e-mail: ach87@mail.ru

E.A. Oleynits – Assistant of the Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: oleinits_e@bsu.edu.ru

I.S. Pronin – Master's student of IFHiB, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

I.P. Blinova – Docent of General Chemistry Department. Dr. Ph.(Chemistry), Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: blinova@bsuedu.ru

I.I. Tynyanaya – Associate Professor of the Department of General Chemistry, Candidate of Chemical Sciences, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: tynyanaya@bsu.edu.ru

Ya.Yu. Salasina – Senior Lecturer of General Chemistry Department. Dr. Ph.(Chemistry), Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: salasina@bsuedu.ru

V.F. Selemenev – Professor of Analytical Chemistry Department, Dr. Sci.(Chemistry), Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 09.02.2023; одобрена после рецензирования 12.03.2023; принята к публикации 22.03.2023.

The article was submitted 09.02.2023; approved after reviewing 12.03.2023; accepted for publication 22.03.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.27

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11142

Оптимизация хроматографического анализа путем использования нового композиционного теплоизоляционного материала на основе аэрогеля и полимерной матрицы в составе термостата газового микрохроматографа

**Игорь Артемьевич Платонов, Владимир Игоревич Платонов[✉],
Екатерина Анатольевна Новикова, Александр Алексеевич Иголкин,
Михаил Евгеньевич Ледаев**

Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия, rovvv@yandex.ru[✉]

Аннотация. В статье представлена сравнительная оценка композиционного теплоизоляционного материала на основе вакуумированных стеклянных микросфер и полимерной силиконовой матрицы с распространёнными теплоизоляционными материалами, используемых в качестве теплоизоляционного слоя для микрофлюидных газохроматографических колонок в составе газового микрохроматографа. Показано, что разработанный теплоизоляционный материал характеризуется температурой эксплуатации до 350°C и коэффициентом теплопроводности 0.045 Вт/(м·К). Экспериментально установлено, что использование данного материала в составе термостата газового микрохроматографа позволяет сократить энергопотребление на 15-25%, увеличить разрешение хроматографических пиков на 5-10% и увеличить стабильность хроматографических параметров при контакте зон термостатирования различных узлов микрохроматографа в 2-3 раза по сравнению с традиционными теплоизоляционными материалами. Полученные результаты позволяют рекомендовать исследуемый материал для совершенствования микроприборов, используемых в газохроматографическом анализе.

Ключевые слова: газовая хроматография, микрофлюидные системы, термостат, термоизоляционные материалы.

Благодарности: работа выполнена в рамках реализации Программы развития Самарского университета на 2021-2030 годы в рамках программы «Приоритет-2030» при поддержке Правительства Самарской области

Для цитирования: Платонов И.А., Платонов В.И., Новикова Е.А., Иголкин А.А., Ледаев М.Е. Оптимизация хроматографического анализа путем использования нового композиционного теплоизоляционного материала на основе аэрогеля и полимерной матрицы в составе термостата газового микрохроматографа // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 2. С. 182-188.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11142>

Original article

Optimization of chromatographic analysis by using a new composite heat insulation material based on aerogel and a polymer matrix as part of a thermostat of a gas microchromatograph

**Igor A. Platonov, Vladimir I. Platonov[✉], Ekaterina A. Novikova,
Alexander A. Igolkin, Mikhail E. Ledyayev**

Korolev Samara National Research University, Samara, Russian Federation, rovvv@yandex.ru[✉]

Abstract. The study presents a comparative assessment of a composite heat insulation material based on evacuated glass microspheres and a polymeric silicone matrix with common heat insulation materials used as a heat



insulating layer for microfluidic gas chromatographic columns as part of a gas microchromatograph. It was shown that the developed heat insulation material is characterized by an operating temperature of up to 350°C and a thermal conductivity coefficient of 0.045 W/(m·K). It has been experimentally established that the use of this material as part of a thermostat of a gas microchromatograph allows to reduce energy consumption by 15-25%, increase the resolution of chromatographic peaks by 5-10%, and increase the stability of chromatographic parameters during the contact of the temperature control zones of various units of the microchromatograph by 2-3 times compared with traditional heat insulation materials. The results obtained allow to recommend the studied material for the improvement of microdevices used in gas chromatographic analysis.

Keywords: gas chromatography, microfluidic systems, thermostat, heat insulation material.

Acknowledgments: the work was carried out as part of the Samara University Development Program for 2021-2030 as part of the Priority 2030 program with the support of the Government of the Samara Region.

For citation: Platonov I.A., Platonov V.I., Novikova E.A., Igolkin A.A., Ledyayev M.E. Optimization of chromatographic analysis by using a new composite heat insulation material based on aerogel and a polymer matrix as part of a thermostat of a gas microchromatograph. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 182-188. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11142>

Введение

Ярко выраженной тенденцией развития современного приборостроения является миниатюризация аналитической аппаратуры. Микроприборы обладают малыми габаритами, весом и энергопотреблением. Кроме того, переход к использованию микроприборов обеспечивает проведение анализа «на месте», что позволяет получать результаты в режиме реального времени, при этом существенно уменьшается вероятность изменения пробы при ее хранении и транспортировке, экономятся время и средства на консервацию и перевозку образцов. Создание микрофлюидных систем различного типа способствуют миниатюризации инструментального обеспечения химического анализа [1].

В области газовой хроматографии технологии микрофлюидных и микроэлектромеханических систем позволяют создавать большое количество разнообразных конструктивных узлов микрохроматографа (хроматографические колонки, дозаторы, термодесорберы и т.д.) [2-5]. Безусловно, при реализации метода газовой хроматографии в микроисполнении необходимо обеспечивать эффективное термостатирование всех узлов и блоков прибора. Эффективность поддержания заданной температуры оказывает существенное влияние на характеристики хроматографического разделения компонентов пробы и газохроматографического анализа в целом. Таким образом,

особое внимание при создании газовых микрохроматографов необходимо уделять термоизоляции, которая должна соответствовать следующим требованиям: диапазон рабочих температур от 0 до 300°C, коэффициент теплопроводности не более 0.1 Вт/(м·К), механическая прочность, низкая плотность, отсутствие летучих компонентов в составе материала.

Целью данной работы являлась сравнительная оценка композиционного материала на основе аэрогеля, вакуумированных стеклянных микросфер и полимерной силиконовой матрицы с распространёнными теплоизоляционными материалами, используемых в качестве теплоизоляционного слоя для микрофлюидных газохроматографических колонок.

Экспериментальная часть

Синтез аэрогеля для изготовления термоизоляционного материала включал следующие этапы: получение золя путем гидролиза тетраэтилортосилана, подкисленной водой в присутствии изопропанола в качестве растворителя, образование геля путем добавления основания и последующее старение геля, замещение растворителя в порах геля, сушка полученного геля.

Методика получения композиционного теплоизоляционного материала включала следующие этапы: смешивание навески силиконового связующего (однокомпонентный высокотемпературный

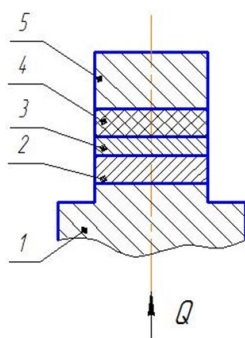


Рис. 1. Тепловая схема измерения теплопроводности
Fig. 1. Thermal scheme for measuring thermal conductivity

силиконовый компаунд) и растворителя (н-гексана), механическое перемешивание смеси до достижения однородности; постепенное добавление наполнителя (вакуумированных микросфер марки «К15» производитель ЗМ (Япония)) и пиролизного аэрогеля при постоянном перемешивании, формование образцов заданной геометрии, сушка образцов при программировании температуры от 40 до 250°C со скоростью нагрева 10°C/мин, термостатирование при 250°C в течение 1 часа для удаления растворителя.

В качестве материалов для сравнения эффективности термоизоляции использовалась минеральная вата и пенополиуретан.

В основе определения теплопроводности лежит метод динамического калориметра с тепломером и адиабатической оболочкой. Для данной цели использовался измеритель теплопроводности ИТ-λ-400 (рисунок 1). Образец из испытуемого материала 4 помещается между опорным стержнем 5 и медной контактной пластиной 3, обладающей высокой теплопроводностью, монотонно разогревается за счёт непрерывного, поступающего через тепломер теплового потока. Тепловой поток, проходящий через среднее сечение пластины 2, частично поглощается ею и далее идёт на разогрев пластины 3, образца 4 и стержня 5. Размеры системы выбраны таким образом, чтобы



Рис. 2. Фотография планарной газохроматографической колонки с термоизоляцией
Fig. 2. Photograph of a planar gas chromatographic column with heat insulation

потоки, аккумулируемые образцом и пластиной, были по крайней мере в 5-10 раз меньше поглощаемых стержнем 5.

Газохроматографический эксперимент проводился на хроматографе «ПИА» с планарной газохроматографической колонкой (материал алюминий, длина канала 1 м, сечение канала 0.8×0.8 мм, адсорбент – молекулярные сита типа NaX) и детектором по теплопроводности. Для создания термостата планарной газохроматографической колонки использовались пластины описанных выше термоизоляционных материалов толщиной 5 мм (рисунок 2).

Исследование хроматографических свойств проводили в двух вариантах. Первый вариант предусматривал размещение планарной хроматографической колонки в термостате без включения в состав газового микрохроматографа микротермодесорбера [5]. Второй вариант предусматривал включение в состав газового микрохроматографа микротермодесорбера, причем термостат микротермодесорбера включал тот же материал, что и планарная хроматографическая колонка. Конструкция газового микрохроматографа предполагает непосредственный контакт зон термостатирования планарной хроматографической колонки и микротермодесорбера, температура микротермодесорбера в ходе газохроматографического эксперимента составляла 150°C.

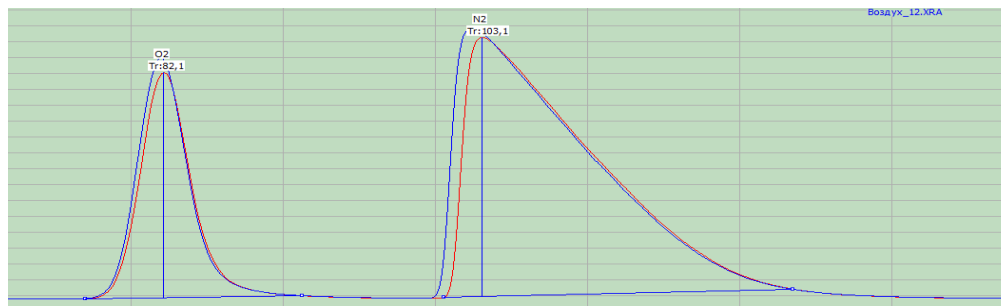


Рис. 3. Хроматограммы разделения кислорода и азота при использовании планарной хроматографической колонки с разработанным композиционным термоизоляционным материалом и пенополиуретаном (температура колонки 60°C, газ-носитель – гелий, расход газа-носителя – 12 см³/мин, объем вводимой пробы – 100 мкл)

Fig. 3. Chromatograms of the separation of oxygen and nitrogen using a planar chromatographic column with the developed composite heat insulation material and polyurethane foam (column temperature is 60°C, carrier gas is helium, carrier gas flow rate is 12 ml/min, injected sample volume is 100 µl)

Таблица 1. Результаты теплофизических исследований термоизоляционных материалов
 Table 1. Results of thermal physical studies of heat insulation materials

Исследуемый материал	Коэффициент теплопроводности, Вт/(м·К)	Среднее энергопотребление, Вт, при различных температурах планарной хроматографической колонки		
		50-100°C	110-150°C	160-200°C
Разработанный термоизоляционный материал	0.045	0.12	0.14	0.15
Пенополиуретан	0.045	0.14	0.17	0.21
Минеральная Вата	0.02	0.21	0.27	0.35

Для сравнительной оценки эффективности работы рассматриваемых термоизоляционных материалов определяли разрешение пиков R_s по формуле:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\tau_{1/2(1)} + \tau_{1/2(2)}}, \quad (1)$$

где $\tau_{1/2(1)}$ и $\tau_{1/2(2)}$ – ширина пиков на половине высоты для сорбатов с меньшим и большим временем удерживания соответственно, мин; t_{R1} и t_{R2} – времена удерживания сорбатов, мин.

Обсуждение результатов

На рисунке 3 представлены примеры хроматограммы разделения кислорода и азота при использовании описанной выше планарной хроматографической колонки различными материалами в составе термостата. Визуально наблюда-

ется повышение эффективности хроматографической колонки при использовании разработанного композиционного термоизоляционного материала, что связано с её более равномерным нагревом.

В таблице 1 представлены результаты теплофизических исследований термоизоляционных материалов. Как видно из представленных в таблице 1 данных минимальное энергопотребление наблюдается для разработанного материала, что обусловлено тем, что он, в отличие от пенополиуретана и минеральной ваты, не деформируется при размещении колонки в корпус микрохроматографа и позволяет избежать потерь тепла при утоньшении и деформации слоя термоизоляции при механических воздействиях, сопровождающих сборку прибора.

Таблица 2. Результаты хроматографических исследований с использованием различных термоизоляционных материалов в составе термостата газового микрохроматографа (без включения в состав газового микрохроматографа микротермодесорбера)

Table 2. Results of chromatographic studies using various heat insulation materials as part of a thermostat of a gas microchromatograph (without including a microthermal desorber in the gas microchromatograph)

Исследуемый материал	Степень разделения пиков азота и кислорода при различных температурах планарной хроматографической колонки $R_s \pm \Delta$ (при $n=5$, $P=0.95$)		
	60°C	80°C	100°C
Разработанный термоизоляционный материал	1.91±0.02	1.89±0.02	1.85±0.02
Пенополиуретан	1.83±0.05	1.78±0.03	1.74±0.03
Минеральная Вата	1.62±0.05	1.51±0.04	1.47±0.04

Таблица 3. Результаты хроматографических исследований с использованием различных термоизоляционных материалов в составе термостата газового микрохроматографа (с включением в состав газового микрохроматографа микротермодесорбера)

Table 3. Results of chromatographic studies using various heat insulation materials as part of a thermostat of a gas microchromatograph (with the inclusion of a microthermal desorber in the gas microchromatograph)

Исследуемый материал	Степень разделения пиков азота и кислорода при различных температурах планарной хроматографической колонки $R_s \pm \Delta$ (при $n=5$, $P=0.95$)		
	60°C	80°C	100°C
Разработанный термоизоляционный материал	1.91±0.05	1.88±0.05	1.85±0.03
Пенополиуретан	1.81±0.12	1.75±0.12	1.69±0.09
Минеральная Вата	1.60±0.15	1.51±0.14	1.40±0.14

В таблицах 2 и 3 представлены результаты степени разрешения пиков кислорода и азота с использованием различных термоизоляционных материалов в составе термостата планарной хроматографической колонки как без включения в состав газового микрохроматографа микротермодесорбера (таблица 2), так и при непосредственном контакте зон термостатирования планарной хроматографической колонки и микротермодесорбера (таблица 3).

В случае использования разрабатываемого термоизоляционного материала наблюдается наибольшее значение степени разрешения пиков. При этом наблюдается уменьшение стабильности разделения пиков при добавлении в состав га-

зового микрохроматографа микротермодесорбера, работающего при более высоких температурах, чем хроматографическая колонка, т.е. наблюдается влияние зон термостатирования двух узлов. В традиционных хроматографах данное влияние минимизировано за счет пространственного разделения зон термостатирования, но в составе микроприборов может привести к существенному ухудшению как качества разделения хроматографических пиков, так и к уменьшению точности хроматографического анализа в целом. Разработанный композиционный материал более эффективно обеспечивает поддержание заданной температуры в хроматографической колонке, его включение в состава газового микрохро-



матографа позволит улучшить как эксплуатационные, так и аналитические характеристики микроприборов.

Заключение

Для оптимизация хроматографического анализа с использованием хроматографа в микроисполнении предложен новый композиционный теплоизоляционный материала на основе аэрогеля и полимерной матрицы. Данный материал был использован для создания термостата газового микрохроматографа. Показано, что разработанный теплоизоляционный материал характеризуется температурой эксплуатации до 350°C и коэффициентом теплопроводности 0.045 Вт/(м·К). Экспериментально установлено, что использование данного материала в составе термостата газового микрохроматографа позволяет сократить энергопотребление

Список литературы/References

1. Mikroflyuidnyye sistemy dlya himicheskogo analiza / Pod red. Zolotova YU.A., Ku-rochkina V.E. M. FIZMATLIT. 2011. 528 p. (In Russ.)
2. Platonov I.A., Platonov V.I., Goryunov M.G. A gas chromatograph based on planar systems. *Journal of Analytical Chemistry*. 2015; 70(9): 1158-1163.
3. Platonov I.A., Kolesnichenko I.N., Pavlova L.V. A mobile diagnostics suite for the express quantitative determination of acetone in exhaled breath. *Sorbtsionnyye i Khromatograficheskiye Protssesy*. 2022; 22(4): 365-

на 15-25%, увеличить разрешение хроматографических пиков на 5-10% и увеличить стабильность хроматографических параметров при контакте зон термостатирования различных узлов микрохроматографа в 2-3 раза по сравнению с традиционными теплоизоляционными материалами. Полученные результаты позволяют рекомендовать исследуемый материал для совершенствования микроприборов, используемых в газохроматографическом анализе.

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.

376. (In Russ.) <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10563>

4. Platonov V., Sharma P., Ledyayev M. etc. Realization of Microfluidic Preconcentrator for N-Pentane Traces Impurities from the Gaseous Media. *Materials*. 2022; 15(22) 80-90. <https://doi.org/10.3390/ma15228090>

5. Platonov I.A., Platonov V.I., Ledyayev M.E. The use of a microthermal desorber for the concentration of trace amounts of hydrocarbons in the air. *Sorbtsionnyye i Khromatograficheskiye Protssesy*. 2021; 21(6): 805-811 <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3825> (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

И.А. Платонов – профессоры кафедры химии, д.т.н., Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия

В.И. Платонов – доцент кафедры химии, к.х.н., Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия

Е.А. Новикова – доцент кафедры химии, к.х.н., Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия

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

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

E.V. Novikova – Ph.D. (chemistry), associate prof., department of Chemistry, Samara National Research University named after academician S.P. Korolev, Samara, Russian Federation, e-mail: novikova.ea@ssau.ru



А.А. Иголкин – профессор кафедры автоматических систем энергетических установок, д.т.н., Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия

М.Е. Ледяев – аспирант кафедры химии, Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия

A.A. Igolkin – prof., grand Ph.D (technics), department of Automatic Systems of Power Plants, Samara National Research University, Samara, Russian Federation

M.E. Ledyayev – the postgraduate student of the Department of Chemistry, Samara National Research University, Samara, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 19.01.2023; одобрена после рецензирования 14.02.2023; принята к публикации 15.02.2023.

The article was submitted 19.01.2023; approved after reviewing 14.02.2023; accepted for publication 15.02.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.543

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11143

Особенности супрамолекулярного хирального распознавания при адсорбции на поверхности кристаллов орто-толуиловой кислоты

Идрис Ниматджонович Муслимов¹, Владимир Юрьевич Гуськов¹✉

¹Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия, guscov@mail.ru✉

Аннотация. В классическом хиральном распознавании предполагается наличие хирального селектора – молекулы с асимметрическим атомом углерода. Однако потенциал для расширения возможностей данного вида распознавания на сегодняшний день практически исчерпан. Поэтому возникает необходимость в поиске новых хиральных селекторов, функционирующих на иных принципах. Поэтому интересно изучить системы, основанные на супрамолекулярной хиральности. Особую важность данному виду хиральности придаёт то, что супрамолекулярная хиральность лежит в основе формирования жизни на Земле. Одним из проявлений супрамолекулярной хиральности являются энантиоморфные кристаллы.

Для таких кристаллов ранее был изучен механизм супрамолекулярного хирального распознавания в случае адсорбции на них оптически активных веществ. Однако для изучения деталей данного механизма необходимо исследовать большое количество отличающихся по свойствам хиральных кристаллов. В данной работе изучены изотермы адсорбции энантиомеров на поверхности энантиоморфных кристаллов о-толуиловой кислоты.

Для получения гомохиральных кристаллов применялся метод созревания Виедмы. Полученные таким образом кристаллы были нанесены на поверхность силикагеля АСКГ. Адсорбция на чистых кристаллах изучалась в условиях обращённой газовой хроматографии с использованием лимоненов в качестве адсорбатов. Для изучения адсорбции ментолов из растворов в н-гептане применялся силикагель, модифицированный кристаллами о-толуиловой кислоты.

Из анализа изотерм адсорбции энантиомеров лимонена заметно, что изотермы различаются при температурах 50 и 60°C. Коэффициент энантиоселективности α , рассчитываемый как отношение большей адсорбции к меньшей, составляет 1.21-1.23. При 70°C различие в адсорбции энантиомеров визуального практически исчезало. Выше 70°C энантиоселективность не наблюдалась. Однако применение t-критерия для оценки значимости отличий изотерм адсорбции показало статистически значимое различие значений равновесной адсорбции начиная с парциального давления 4.17 кПа и выше. Изотермы адсорбции были отнесены к III типу по классификации БЭТ и аппроксимировались уравнением Фрейндлиха. В случае адсорбции ментолов из растворов, различается даже форма изотермы. Так, изотерма адсорбции D-ментола может быть отнесена к I типу по классификации БЭТ, и при большинстве изучаемых концентраций энантиомера близка к линейной. В то же время, форма изотермы адсорбции L-ментола близка ко II типу. Таким образом, на модифицированном о-толуиловой кислотой силикагеле различается механизм адсорбции. Коэффициент энантиоселективности равнялся 1.45. Таким образом, достигнутые коэффициенты энантиоселективности на о-толуиловой кислоте оказались одними из лучших среди ранее изученных энантиоморфных кристаллов.

Ключевые слова: о-толуиловая кислота, созревание Виедмы, изотермы адсорбции, хиральное распознавание, супрамолекулярная хиральность

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-10079)

Для цитирования: Муслимов И.Н., Гуськов В.Ю. Особенности супрамолекулярного хирального распознавания при адсорбции на поверхности кристаллов орто-толуиловой кислоты // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 189-198. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11143>



Original article

Peculiarities of supramolecular chiral recognition upon adsorption on the surface of ortho-toluic acid crystals

Idris N. Muslimov¹, Vladimir Yu. Guskov¹✉

¹Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, deineka@bsu.edu.ru✉

²Voronezh State University, Voronezh, Russia

Abstract. Classical chiral recognition assumes the presence of a chiral selector, a molecule with an asymmetric carbon atom. However, the potential for expanding the capabilities of this type of recognition is almost exhausted today. Therefore, there is a need to search for new chiral selectors that operate on different principles. Therefore, it is interesting to study systems based on supramolecular chirality. This type of chirality is of particular importance due to the fact that supramolecular chirality underlies the formation of life on Earth. One manifestation of supramolecular chirality is enantiomorphic crystals.

For such crystals, the mechanism of supramolecular chiral recognition was previously studied in the case of adsorption of optically active substances on them. However, a detailed study of this mechanism required investigation of a large number of chiral crystals with different properties. In this study, we investigated the adsorption isotherms of enantiomers on the surface of enantiomorphic crystals of o-toluic acid.

The Viedma ripening method was used to obtain homochiral crystals. The crystals obtained in this way were deposited on the surface of ASKG silica gel. Adsorption on pure crystals was studied under reversed gas chromatography conditions using limonenes as adsorbates. Silica gel modified with o-toluic acid crystals was used to study the adsorption of menthols from solutions in n-heptane.

The analysis of the adsorption isotherms of limonene enantiomers showed that the isotherms differ at temperatures of 50 and 60°C. The enantioselectivity coefficient α , calculated as the ratio of higher adsorption to lower adsorption, is 1.21-1.23). At 70°C, the difference in the adsorption of enantiomers visually practically disappeared. Above 70°C enantioselectivity was not observed. However, the use of the t-criterion for assessment of the differences in adsorption isotherms showed a statistically significant difference in the equilibrium adsorption starting from a partial pressure of 4.17 kPa and higher. The adsorption isotherms were assigned to type III according to the BET classification and were approximated by the Freundlich equation.

In the case of adsorption of menthols from solutions, even the shape of the isotherm was different. Thus, the adsorption isotherm of D-menthol can be classified as type I according to the BET classification, and is close to linear for the majority of the studied enantiomer concentrations. At the same time, the shape of the L-menthol adsorption isotherm is close to type II. Thus, the mechanism of adsorption on silica gel modified with o-toluic acid is different. The enantioselectivity coefficient was 1.45. Thus, the achieved enantioselectivity coefficients for o-toluic acid turned out to be among the best coefficients for previously studied enantiomorphic crystals.

Keywords: o-toluic acid, Viedma ripening, adsorption isotherms, chiral recognition, supramolecular chirality.
Acknowledgments: the financial support of the Russian Science Foundation is gratefully acknowledged (project No. 19-73-10079).

For citation: Muslimov I.N., Guskov V.Yu. Peculiarities of supramolecular chiral recognition upon adsorption on the surface of ortho-toluic acid crystals. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 189-198. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11143>

Введение

Хиральное распознавание является ключевым процессом в органическом синтезе, конструировании биополимеров и создании совместимых имплантов, для решения задач фармакологии, медицины, фотоники и ряда других отраслей [1, 2]. Классическое хиральное распознавание предполагает наличие хирального селек-

тора – молекулы с асимметрическим атомом углерода [3]. При взаимодействии энантиомеров с таким селектором образующиеся комплексные соединения представляют собой уже диастереомерную пару, различающуюся по физико-химическим характеристикам. Подобный подход позволил Даванкову [4, 5] и Гил-Аву [6] более 50 лет назад выполнить первые хроматографические разделения энантиомеров.



Однако на сегодняшний день практически исчерпан потенциал для расширения возможностей распознавания и разделения энантиомеров через классический молекулярный хиральное механизм. Так, в газовой хроматографии уже несколько десятилетий основными энантиоселективным неподвижными фазами являются циклодекстрины [7, 8]. Несмотря на ряд попыток создать более совершенные хиральные неподвижные фазы, ни один из предложенных вариантов не сумел превзойти циклодекстрины [9]. Поэтому возникает необходимость в поиске новых хиральных селекторов, функционирующих на иных принципах.

В этой связи, привлекательными представляются системы, основанные на супрамолекулярной хиральности. Объекты с данным видом хиральности могут быть получены в результате определённого взаимного пространственного расположения молекул [10]. Элемент хиральности в таком случае имеет более высокий уровень иерархии, чем молекула – он состоит из нескольких единиц, а в некоторых случаях из нескольких десятков и сотен молекул или атомов. Супрамолекулярная хиральность лежит в основе формирования жизни на Земле. Так, все полипептиды, ДНК и РНК представляют собой хиральные супрамолекулярные структуры, поскольку формируют правовращающие α -спирали, стабилизированные слабым вандерваальсовыми взаимодействиями и водородными связями [11, 12]. Одним из проявлений супрамолекулярной хиральности являются энантиоморфные кристаллы. Такие объекты обычно могут быть получены при кристаллизации оптически чистых веществ [13]. Однако встречаются случаи, когда не имеющие асимметрического атома углерода соединения кристаллизуются в виде конгломератов с хиральной пространственной группой симметрии [14, 15]. Подобные кристаллы в большей степени подходят для изучения эффекта су-

прамолекулярного хирального распознавания, так как отсутствует влияние классического молекулярного распознавания.

Ранее нами были изучены особенности хирального распознавания супрамолекулярно хиральной поверхностью ряда энантиоморфных кристаллов [16-18] и некоторых двумерных супрамолекулярных структур ахиральных молекул [19-21]. Установленный механизм распознавания молекул энантиомеров на такой поверхности предполагает формирование монослоя адсорбированного вещества. Хиральное распознавание происходит за счёт влияния поверхности на объект такого же уровня иерархии – адсорбционного слоя. В результате этого энергия латеральных взаимодействий адсорбированных энантиомеров различается. Однако пока не удалось достоверно установить, как именно поверхность с супрамолекулярной хиральностью влияет на формирование адсорбционного слоя энантиомеров. Для установления всех деталей механизма супрамолекулярного хирального распознавания при адсорбции необходимы сведения об особенностях адсорбции на существенном наборе различных по природе энантиоморфных кристаллах. В данной работе изучены изотермы адсорбции энантиомеров на поверхности энантиоморфных кристаллов о-толуиловой кислоты.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования были выбраны кристаллы орто-толуиловой кислоты (99%, Sigma Aldrich, China, CAS № 118-90-1). Для изучения адсорбции из растворов кристаллы о-толуиловой кислоты наносились на поверхность силикагеля АСКГ (Россия, CAS № 112926-00-8).

Для получения гомохиральных кристаллов применялся метод созревания Виедмы. Для этого в 160 см³ ацетонитрила растворяли 17 г о-толуиловой кислоты. При этом, после растворения 3.4 г толуиловой кислоты оставались в виде

осадка. Добавляли 9 г стеклянных шариков для создания эффекта «мельницы». Полученную суспензию подвергали размешиванию со скоростью 1000 об/мин в течение 2 ч, и далее оставляли для созревания на двое суток.

Метод обращённой газовой хроматографии является достаточно чувствительным, чтобы достоверно определить адсорбцию паров на непористых кристаллах с низкой адсорбционной активностью. Однако для изучения адсорбции из растворов требуется большая удельная поверхность. Поэтому для исследования адсорбции ментолов из растворов в н-гептане полученные в условиях созревания Виедмы кристаллы о-толуиловой кислоты перекристаллизовывали на поверхности силикагеля. Для этого к 50 г силикагеля АСКГ добавляли 220 см³ ацетонитрила и 10 г кристаллов. Суспензия перемешивалась в течение 2 часов, далее осадок фильтровался и сушился.

Полученным образцом забивали стальную колонку длиной 50 см. Исследование проводилось на газовом хроматографе «Хромос ГХ-1000» с пламенно-ионизационным детектором. Скорость газа-носителя азота составляла 3 см³/мин. Температура испарителя и детектора составляла 200°C. В качестве адсорбируемых веществ применяли (R)-(+)-лимонен (97%, Sigma-Aldrich, США, CAS № 5969-27-5) и (S)-(-)-лимонен (96%, Sigma-Aldrich, США, CAS № 5989-54-8).

Объём анализируемого вещества варьировался от 0.5 до 1 мкл. Введение в колонку проб большего объёма сопровождалось сильным размыванием пика, в связи с чем адекватная интерпретация хроматограмм становилась невозможной. О достижении квазиравновесного состояния судили по наложению более размытой ветви пиков разной высоты друг на друга.

Расчёт величины равновесной адсорбции (a , мкмоль/г) и давления адсорбата в газовой фазе (p , Па) проводился по следующим уравнениям [22]:

$$a = \frac{m_a S_{adc}}{m S_{ника}} \quad (1)$$

$$p = \frac{m_a h}{S_{ника} \omega} RT \quad (2)$$

где m_a – количество вводимого адсорбата, мкмоль; m – масса сорбента в колонке, г; S_{adc} – площадь адсорбции компонента, мм²; $S_{ника}$ – площадь пика адсорбата, мм²; h – высота пика, мм; ω – скорость газаносителя, мл/с. Расчёт площади адсорбции выполнялся в зависимости от формы пика согласно [22]. Построенные изотермы адсорбции анализировались на предмет соответствия какому-либо типу по классификации БЭТ, и далее аппроксимировались соответствующим уравнением.

Адсорбция энантиомеров ментола из растворов изучалась по следующему алгоритму. Модифицированный о-толуиловой кислотой образец силикагеля массой 0.5 г. был добавлен в раствор D- или L-ментола в н-гептане. Объём раствора составлял 30 см³. Концентрация ментолов варьировалась от 20 до 130 мкг/см³. Далее суспензия помещалась на шейкер и перемешивалась в течение 1 часа. Концентрация ментолов до и после адсорбции контролировалась газохроматографически в условиях, аналогичных [16, 18].

Обсуждение результатов

На рис. 1-3 приведены изотермы адсорбции лимоненов на кристаллах о-толуиловой кислоты, полученных в условиях созревания Виедмы. Как видно из полученных данных, изотермы адсорбции энантиомеров различаются при температурах 50 и 60°C. Так, при 50°C наибольшее различие наблюдалось при самом большом значении парциального давления паров в диапазоне изучаемых давлений – при 1.65 кПа. В этом случае адсорбция S-(-)-лимонена составляет 4.9 мкмоль/г, в то время как адсорбция R-(+)-лимонена – 4.0 мкмоль/г. Коэффициент энантиоселективности α , рассчитываемый как отношение большей адсорбции к меньшей, составляет 1.23. Это является

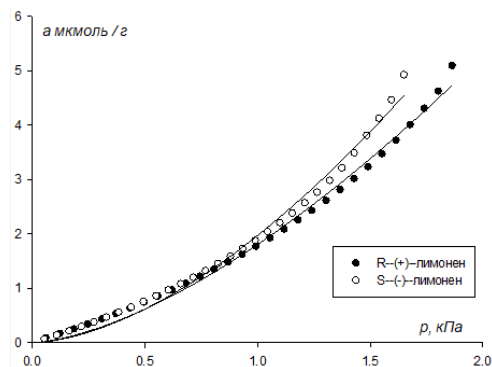


Рис. 1. Изотермы адсорбции паров лимоненов при 50°C на кристаллах о-толуиловой кислоты, полученных в условиях созревания Виедмы

Fig. 1. Adsorption isotherms of limonene vapours at 50°C on o-toluic acid crystals obtained under Viedma ripening conditions

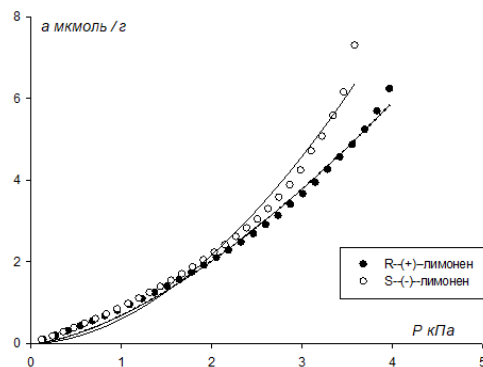


Рис. 2. Изотермы адсорбции паров лимоненов при 60°C на кристаллах о-толуиловой кислоты, полученных в условиях созревания Виедмы

Fig. 2. Adsorption isotherms of limonene vapours at 60°C on o-toluic acid crystals obtained under Viedma ripening conditions

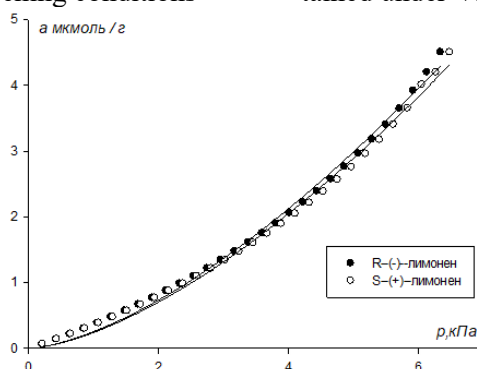


Рис. 3. Изотермы адсорбции паров лимоненов при 70°C на кристаллах о-толуиловой кислоты, полученных в условиях созревания Виедмы

Fig. 3. Adsorption isotherms of limonene vapours at 70°C on o-toluic acid crystals obtained under Viedma ripening conditions

одним из лучших результатов для непо-
ристых энантиоморфных кристаллов.
При 60°C наиболее существенное разли-
чие значений адсорбции также наблюда-
лось при максимально возможном парци-
альном давлении: при 3.5 кПа значения
равновесной адсорбции S-(-)-лимонена и
R-(+)-лимонена составляли 6.1
и 4.9 мкмоль/г соответственно ($\alpha=1.21$).
При 70°C различие в адсорбции энантио-
меров практически исчезало. Также было
затруднительно выделить значения рав-
новесной адсорбции энантиомеров с
близкими парциальными давлениями.
Оценочный коэффициент селективности
составлял 1.1. Выше 70°C энантиоселек-
тивность не наблюдалась. Таким обра-

зом, анализ полученных изотерм адсорб-
ции показал способность поверхности о-
толуиловой кислоты к хиральному распо-
знаванию в диапазоне температур 50-70°C.

Для проверки значимости отличий
значений адсорбции энантиомеров на
хроматограммах применялся t-критерий.
Данный классический статистический
метод оказался применимым при анализе
величин адсорбции при одинаковых пар-
циальных давлениях (концентрациях).
При этом в качестве нуль-гипотезы вы-
двигается гипотеза о том, что значения
адсорбции энантиомеров равны. Если
экспериментально рассчитанная довери-
тельная вероятность P больше критиче-
ской степени значимости α (или, в старых

Таблица 1. Значения доверительной вероятности Р t-критерия для пар значений адсорбции при близких парциальных давлениях (критическая степень значимости $\alpha=0.05$)

Table 1. Confidence level P of the t-criterion for pairs of adsorption values at close partial pressures (critical degree of significance $\alpha=0.05$)

50°C		60°C		70°C	
p, кПа	P	p, кПа	P	p, кПа	P
0.12	0.0107	0.46	0.0020	0.42	0.6162
0.19	0.0100	1.07	0.0047	0.63	0.7381
0.25	0.0214	1.38	0.0012	0.83	0.8021
0.37	0.1491	1.53	0.3700	1.04	0.8642
0.50	0.6332	1.68	0.0046	1.25	0.9299
0.62	0.7700	1.99	0.0015	2.50	0.8769
0.68	0.5835	2.29	0.0007	4.17	0.0050
0.74	0.4692	2.44	0.0010	4.38	0.0051
0.99	0.0700	2.60	0.0016	4.59	0.0057
1.05	0.0600	2.75	0.0006	5.42	0.0066
1.11	0.0618	2.90	0.0008	5.64	0.0072
1.55	0.0044	3.36	0.0005	5.84	0.0088

Таблица 2. Результаты аппроксимации изотерм адсорбции уравнением Фрейндлиха: значения констант Фрейндлиха K_F , коэффициента n, а также коэффициенты линейной корреляции

Table 2. The results of approximation of adsorption isotherms by the Freundlich equation: values of the Freundlich constants K_F , coefficient n, linear correlation coefficients

T	R-(+)-Лимонен			S-(-)-Лимонен		
	K_F	n	r	K_F	n	r
50	1.81	1.55	0.993459	1.97	1.67	0.990989
60	0.60	1.84	0.979454	0.69	1.55	0.994033
70	0.24	1.53	0.99506	0.25	1.53	0.995548

подходах, экспериментальное значение t-критерия меньше теоретического), то нуль-гипотеза подтверждается, и различий не наблюдаются. Если же $P < \alpha$, то верна альтернатива, и различие в значениях адсорбции значимо.

Данные по выполнению t-критерия для значений адсорбции паров лимоненов приведены в табл. 1. Как видно из полученных данных, статистически значимое различие наблюдается для значений адсорбции при 70°C начиная с парциального давления 4.17 кПа и выше. Таким образом, несмотря на кажущуюся близость изотерм адсорбции лимоненов при 70°C, они статистически значимо различаются.

Из рисунков видно, что изотермы могут быть отнесены к III типу по классификации БЭТ. По этой причине экспериментальные данные аппроксимировались

уравнением Фрейндлиха. Результаты аппроксимации приведены в табл. 2. Как видно из полученных данных, константы Фрейндлиха различаются при температурах 50 и 60°C, в то время как при 70°C отличий в параметрах аппроксимации не наблюдается. Таким образом, результаты обработки изотерм уравнением Фрейндлиха подтверждают сделанные выше выводы.

На рис. 4 приведены изотермы адсорбции энантиомеров ментолов на силикагеле, модифицированном кристаллами о-толуиловой кислоты. Как видно из рисунка, форма изотерм различается. Так, изотерма адсорбции D-ментола может быть отнесена к I типу по классификации БЭТ, и при большинстве изучаемых концентраций энантиомера близка к линейной. В то же время, форма изотермы адсорбции L-ментола близка ко II типу.

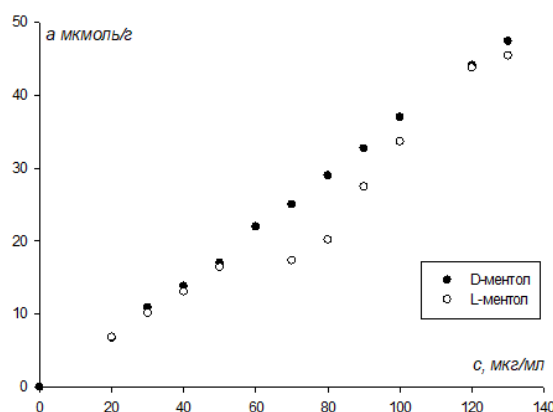


Рис. 4. Изотермы адсорбции энантиомеров ментола из раствора в н-гептане на силикагеле, модифицированном кристаллами о-толуиловой кислоты

Fig. 4. Adsorption isotherms of menthol enantiomers from a solution in n-heptane on silica gel modified with o-toluic acid crystals

Таким образом, на модифицированном о-толуиловой кислотой силикагеле различается механизм адсорбции. В случае L-ментола прослеживается образование монослоя при адсорбции равной 17 мкмоль/г. В случае D-ментола образования монослоя в диапазоне изучаемых концентраций обнаружено не было. Вероятно, такое различие обусловлено затруднением формирования слоя D-ментола на супрамолекулярно хиральной поверхности. В этом случае до завершения формирования монослоя начинает образовываться второй слой, в котором молекулы D-ментола взаимодействуют не с самой поверхностью, а с первым слоем энантиомера. Возникающее при этом заметное различие в энергии адсорбции с образующим монослой L-ментолом приводит к большему, чем в случае адсорбции из газовой фазы, хиральному распознаванию. Так, наибольшая энантиоселективность наблюдалась при концентрации ментолов 70 мкг/см³. Коэффициент энантиоселективности равнялся 1.45, что выше, чем при хиральном распознавании паров лимоненов.

Ещё одной отличительной особенностью адсорбции ментолов из растворов является область хирального распознавания на изотерме. Как видно из рисунков, в случае паров лимоненов максимальная

энантиоселективность была обнаружена при максимальном парциальном давлении паров. В то же время, для ментолов выше концентрации 100 мкг/см³ различия в адсорбции энантиомеров не наблюдалось. Данное явление прослеживалось и для других энантиоморфных кристаллов [16-18], и обусловлено формированием второго слоя L-ментола. Энергия адсорбции второго слоя всегда равна энергии конденсации, идентичной для энантиомеров, что делает хиральное распознавание невозможным.

Заключение

В работе установлено, что кристаллы о-толуиловой кислоты, полученные в условиях созревания Виедмы, способны к проявлению хирального распознавания относительно паров энантиомеров лимонена, и растворённых в н-гептане энантиомеров ментола. Установлено, что распознавание оптических изомеров лимонена кристаллами о-толуиловой кислоты наблюдается только в диапазоне температур 50-70°C. Достигнутые коэффициенты энантиоселективности на о-толуиловой кислоте оказались одними из лучших среди ранее изученных энантиоморфных кристаллов.



Конфликт интересов

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

Список литературы

1. Bruin A.G.d., Barbour M.E., Briscoe W.H. Macromolecular and supramolecular chirality: a twist in the polymer tales // *Polymer International*. 2014. Vol. 63. P. 165-171.

2. Purcell-Milton F., McKenna R., Brennan L.J., Cullen C.P., Guillemeney L., Tepliakov N.V., Baimuratov A.S., Rukhlenko I.D., Perova T.S., Duesberg G.S., Baranov A.V., Fedorov A.V., Gun'ko Y. Induction of chirality in two-dimensional nanomaterials: chiral 2D MoS₂ nanostructures // *ACS Nano*. 2018. Vol. 12. P. 954-964.

3. Davankov V.A. The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction? // *Chirality*. 1997. Vol. 9. P. 99-102.

4. Rogozhin S.V., Davankov V.A. Ligand chromatography on asymmetric complex-forming sorbents as a new method for resolution of racemates // *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*. 1971. no 10. P. 490a.

5. Davankov V.A., Rogozhin S.V. Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper (II) complexes // *Journal of Chromatography A*. 1971. Vol. 60, no 2. P. 280-283.

6. Gil-Av E., Feibush B., Charles-Sigler R. Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase // *Tetrahedron Letters*. 1966. Vol. 7, no 10. P. 1009-1015.

7. Shen G., Cui J., Yang X., Ling Y. Capillary GC using pyridyl β -cyclodextrin stationary phase // *Journal of Separation Science*. 2009. Vol. 32, no 1. P. 79-87.

8. Modified Cyclodextrins for Chiral Separation / W. Tang, S.-C. Ng, D. Sun. Berlin. Springer. 2013. 218 p.

9. Гуськов В.Ю., Майстренко В.Н. Новые хиральные неподвижные фазы: получение, свойства, применение в газовой хроматографии // *Журнал аналитической химии*. 2018. Т.73, № 10. С. 727-738.

могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

10. Liu M., Zhang L., Wang T. Supramolecular chirality in self-assembled systems // *Chemical Reviews*. 2015. Vol. 115, no 15. P. 7304-7397.

11. Blackmond D.G. The Origin of Biological Homochirality // *Cold Spring Harbor Perspect Biol*. 2019. Vol. 11. P. a032540.

12. Yang Y., Zhang Y., Wei Z. Supramolecular helices: chirality transfer from conjugated molecules to structures // *Advanced Materials*. 2013. Vol. 25. P. 6039-6049.

13. Walsh M.P., Barclay J.A., Begg C.S., Xuan J., Johnson N.T., Cole J.C., Kitching M.O. Identifying a hidden conglomerate chiral pool in the CSD // *Journal of American Chemical Society*. 2022. Vol. 2. P. 2235-2250.

14. Matsumoto A., Kaimori Y., Kawasaki T., Soai K. Asymmetric autocatalysis initiated by crystal chirality of achiral compounds // *Advances in Asymmetric Autocatalysis and Related Topics* / Pályi G., Zucchi C. Elsevier. 2017. P. 337-355.

15. Matsuura T., Koshima H. Introduction to chiral crystallization of achiral organic compounds. Spontaneous generation of chirality // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2005. Vol. 6. P. 7-24.

16. Gus'kov V.Y., Gallyamova G.A., Sairanova N.A., Sharafutdinova Y.F., Khalilov L.M., Mukhametzyanov T.A., Zinoviev I.M., Gainullina Y.Y. Possibility of chiral recognition by adsorption on enantiomorphous crystals: the impact of crystal surface polarity // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2022. Vol. 24. P. 26785-26794.

17. Yu.Gus'kov V., Shayakhmetova R.K., Allayarova D.A., Sharafutdinova Y.F., Gilfanova E.L., N.Pavlova I., Garipova G.Z. Mechanism of chiral recognition by enantiomorphous cytosine crystals during enantiomer adsorption // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2021. Vol. 23. P. 11968-11979.

18. Gus'kov V.Y., Allayarova D.A., Garipova G.Z., Pavlova I.N. Supramolecular



chiral surface of nickel sulfate hexahydrate crystals and its ability to chiral recognition by enantiomers adsorption data // *New Journal of Chemistry*. 2020. Vol. 44. P. 17769-17779.

19. Gus'kov V.Y., Gainullina Y.Y., Musina R.I., Zaripova A.I., Pavlova I.N. The emergence of chirality in cyanuric acid conglomerates by Viedma ripening: surface characterisation and chirality assessment // *Separation Science and Technology*. 2021. Vol. 56, no 3. P. 527-540.

20. Gus'kov V.Y., Gainullina Y.Y., Suhareva D.A., Sidel'nikov A.V., Kudasheva F.K. Chiral surfaces formed by uracil, 5-hydroxy-6-methyluracil and melamine supramolecular structures // *International Journal of Applied Chemistry*. 2016. Vol. 12, no 3. P. 359-373.

21. Нафикова А.Р., Аллаярова Д.А., Гуськов В.Ю. Разделение энантиомеров 2-бромбутана, 2-хлорбутана, 2-хлорпентана и бутанола-2 на неподвижной фазе на основе супрамолекулярной структуры урацила // *Журнал аналитической химии*. 2019. Т.74, № 6. С. 415-420.

22. Газо-адсорбционная хроматография / Киселёв А.В., Яшин Я.И. М. Химия. 1967. 256 с.

References

1. Bruin A.G.d., Barbour M.E., Briscoe W.H. Macromolecular and supramolecular chirality: a twist in the polymer tales. *Polymer International* 2014; 63: 165-171.

2. Purcell-Milton F., McKenna R., Brennan L.J., Cullen C.P., Guillemeney L., Teplakov N.V., Baimuratov A.S., Rukhlenko I.D., Perova T.S., Duesberg G.S., Baranov A.V., Fedorov A.V., Gun'ko Y. Induction of chirality in two-dimensional nanomaterials: chiral 2D MoS₂ nanostructures. *ACS Nano*. 2018; 12: 954-964. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b06691>

3. Davankov V.A. The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction? *Chirality*. 1997; 9: 99-102.

4. Rogozhin S.V., Davankov V.A. Ligand chromatography on asymmetric complex-forming sorbents as a new method for resolution of racemates. *Journal of the*

Chemical Society D: Chemical Communications. 1971; 10: 490a

5. Davankov V.A., Rogozhin S.V. Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper (II) complexes. *Journal of Chromatography A*. 1971; 60(2): 280-283.

6. Gil-Av E., Feibush B., Charles-Sigler R. Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase. *Tetrahedron Letters*. 1966; 7(10): 1009-1015.

7. Shen G., Cui J., Yang X., Ling Y. Capillary GC using pyridyl β -cyclodextrin stationary phase. *Journal of Separation Science*. 2009; 32(1): 79-87. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800477>.

8. Modified Cyclodextrins for Chiral Separation. / W. Tang, S.-C. Ng, D. Sun. Berlin. Springer. 2013. 218 p.

9. Gus'kov V.YU., Majstrenko V.N. Novye hiral'nye nepodvizhnye fazy: poluchenie, svoystva, primenenie v gazovoj hromatografii. *Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2018; 73(10): 727-738.

<https://doi.org/10.1134/S004445021810002X> (In Russ.)

10. Liu M., Zhang L., Wang T. Supramolecular chirality in self-assembled systems. *Chemical Reviews* 2015; 115(15): 7304-7397.

<https://doi.org/10.1021/cr500671p>

11. Blackmond D.G. The Origin of Biological Homochirality. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019; 11: a032540. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032540>

12. Yang Y., Zhang Y., Wei Z. Supramolecular helices: chirality transfer from conjugated molecules to structures. *Advanced Materials* 2013; 25: 6039-6049.

13. Walsh M.P., Barclay J.A., Begg C.S., Xuan J., Johnson N.T., Cole J.C., Kitching M.O. Identifying a hidden conglomerate chiral pool in the CSD. *Journal of American Chemical Society*. 2022; 2: 2235-2250. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00394>

14. Matsumoto A., Kaimori Y., Kawasaki T., Soai K. Asymmetric autocatalysis initiated by crystal chirality of achiral compounds // *Advances in Asymmetric Autocatalysis and*



Related Topics / Pályi G., Zucchi C. Elsevier. 2017: 337-355.

15. Matsuura T., Koshima H. Introduction to chiral crystallization of achiral organic compounds. Spontaneous generation of chirality. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2005; 6: 7-24. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2005.02.002>

16. Gus'kov V.Y., Gallyamova G.A., Sairanova N.A., Sharafutdinova Y.F., Khalilov L.M., Mukhametzyanov T.A., Zinoviev I.M., Gainullina Y.Y. Possibility of chiral recognition by adsorption on enantiomorphous crystals: the impact of crystal surface polarity. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2022; 24: 26785-26794. <https://doi.org/10.1039/d2cp01212j>

17. Yu. Gus'kov V., Shayakhmetova R.K., Allayarova D.A., Sharafutdinova Y.F., Gilfanova E.L., N. Pavlova I., Garipova G.Z. Mechanism of chiral recognition by enantiomorphous cytosine crystals during enantiomer adsorption. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2021; 23: 11968-11979.

18. Gus'kov V.Y., Allayarova D.A., Garipova G.Z., Pavlova I.N. Supramolecular chiral surface of nickel sulfate hexahydrate crystals and its ability to chiral recognition by

enantiomers adsorption data. *New Journal of Chemistry*. 2020; 44: 17769-17779. <https://doi.org/10.1039/d0nj03912h>

19. Gus'kov V.Y., Gainullina Y.Y., Musina R.I., Zaripova A.I., Pavlova I.N. The emergence of chirality in cyanuric acid conglomerates by Viedma ripening: surface characterisation and chirality assessment. *Separation Science and Technology*. 2021; 56(3): 527-540. <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1723030>

20. Gus'kov V.Y., Gainullina Y.Y., Suhareva D.A., Sidel'nikov A.V., Kudasheva F.K. Chiral surfaces formed by uracil, 5-hydroxy-6-methyluracil and melamine supramolecular structures. *International Journal of Applied Chemistry*. 2016; 12(3): 359-373.

21. Nafikova A.R., Allayarova D.A., Gus'kov V.Yu. Separation of 2-bromobutane, 2-chlorobutane, 2-chloropentane, and 2-butanol enantiomers using a stationary phase based on a supramolecular uracil structure. *Journal of Analytical Chemistry*. 2019; 74(6): 565-569. <https://doi.org/10.1134/S0044450219060094>

22. Gas-Adsorption Chromatography / A.V. Kiselev, Ya.I. Yashin. Springer. 1967. 268 p.

Информация об авторах / Information about the authors

И.Н. Муслимов – магистрант 2 года обучения химического факультета Уфимского университета науки и технологий; Уфа, Россия

В.Ю. Гуськов – д.х.н., зав. кафедрой кафедры аналитической химии химического факультета Уфимского университета науки и технологий, Уфа, Россия

I.N. Muslimov – magistracy student of 2 year, Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russian Federation, E-mail: muslimovidris1999@gmail.com

Gus'kov Vladimir Yu. – Prof., head of the department of Chemistry, Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russian Federation, E-mail: gus-cov@mail.ru

Статья поступила в редакцию 03.03.2023; одобрена после рецензирования 28.03.2023; принята к публикации 30.03.2023.

The article was submitted 03.02.2023; approved after reviewing 28.03.2023; accepted for publication 30.03.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.545.2

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11144

Экспресс метод определения анионов в алкогольных напитках на основе сочетания КЭ-КД

Наталья Викторовна Шелехова¹

¹ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия, 4953610101@mail.ru[✉]

Аннотация. Контроль химического состава алкогольных напитков является важной задачей, однако, известные инструментальные методики анализа не всегда позволяют проводить идентификацию и количественное определение целевых компонентов, обеспечивая при этом достаточное разрешение и чувствительность. В этой связи актуальной аналитической задачей становится разработка высокоэффективной методики, обеспечивающей экспрессную, высокоточную и достоверную идентификацию и количественное определение анионного состава спиртных напитков, что и определило цель настоящего исследования. В качестве объектов исследования использовали модельные растворы, содержащие: хлориды, нитраты, сульфаты, оксалаты, формиаты, фториды, фумараты, тартраты, малаты, цитраты, сукцинаты, гликоляты, ацетаты, лактаты, фосфаты, бензоаты и реальные образцы дистиллированных спиртных напитков. Исследование проводили на системах капиллярного электрофореза Agilent 7100, PrinCE 560 и 750. Регистрацию аналитического сигнала осуществляли при помощи детектора TraceDec кондуктометрическим способом. Для разработки методики выбран метод капиллярного электрофореза, подобрана композиция буферного раствора, содержащая 0.2M HIS, 0.2 MES, 1% Triton X-100, особо чистая вода, pH 5.5, по своему составу обеспечивающая одновременное селективное определение 16 анионов органических и неорганических кислот в дистиллированных спиртных напитках. Отработаны лучшие условия и режимы использования системы капиллярного электрофореза, обеспечивающие максимальное разделение и чувствительность: напряжение +20 кВ, ввод пробы гидродинамический, детектирование кондуктометрическое, температура капилляра, 24°C, давление ввода пробы 30мБар, время ввода пробы 25с, время анализа 10 мин. Найдена линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации целевых ионов в интервале 0.10-20.0 мг/дм³. Границы относительной погрешности методики измерений не превышает 25%. Экспериментально подтверждено, что в подобранных условиях целевые ионы дают воспроизводимые площади пиков и времена миграции, что позволяет проводить идентификацию по времени удерживания и количественное определение методом абсолютной градуировки. Проведенные исследования являются основой для разработки аттестованной методики одновременного определения 16 анионов органических и неорганических кислот за 10 мин в спиртных дистиллированных напитках.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, кондуктометрическое детектирование, идентификация, анионы, кислоты, спиртные напитки

Благодарности: исследования проводились в рамках выполнения Государственного задания по теме №041020220006

Для цитирования: Шелехова Н.В. Экспресс метод определения анионов в алкогольных напитках на основе сочетания КЭ-КД // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 199-215. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11144>

Original article

Express method for the determination of anions in alcoholic beverages based on the CE-CD combination

Natalya Viktorovna Shelekhova¹

¹Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation, 4953610101@mail.ru[✉]

Abstract. The control of the chemical composition of alcoholic beverages is an important task, however, the known instrumental methods of analysis do not always allow the identification and quantification of target components, while providing sufficient resolution and sensitivity. In this regard, the development of a highly efficient technique that provides express, highly accurate and reliable identification and quantitative determination of the anionic composition of alcoholic beverages becomes an urgent analytical task, which determined the purpose of this study. The objects of study were model solutions containing: chlorides, nitrates, sulphates, oxalates, formates, fluorides, fumarates, tartrates, malates, citrates, succinates, glycolates, acetates, lactates, phosphates, benzoates and real samples of distilled alcoholic beverages. The study was carried out on Agilent 7100, PrinCE 560 and 750 capillary electrophoresis systems. The analytical signal was recorded using a TraceDec detector by the conductometric method. For the development of the technique, the method of capillary electrophoresis was chosen, the following composition of the buffer solution was selected: 0.2 M HIS, 0.2 MES, 1% Triton X-100, extra pure water, pH 5.5, which provides simultaneous selective determination of 16 anions of organic and inorganic acids in distilled alcoholic drinks. The best conditions and modes of using the capillary electrophoresis system have been worked out, providing maximum separation and sensitivity: voltage +20 kV, hydrodynamic sample injection, conductometric detection, capillary temperature, 24°C, sample injection pressure 30 mbar, sample injection time 25 s, analysis time 10 min. A linear dependence of the analytical signal on the target ion concentration was found in the range of 0.10-20.0 mg/dm³. The limits of the relative error of the measurement technique does not exceed 25%. It has been experimentally confirmed that, under selected conditions, the target ions provide reproducible peak areas and migration times, which allowed carrying out identification based on retention time and quantification using the absolute calibration method. The conducted studies are the basis for the development of a certified method for the simultaneous determination of 16 anions of organic and inorganic acids in 10 minutes in distilled alcoholic beverages.

Keywords: capillary electrophoresis, conductometric detection, identification, anions, acids, alcoholic beverages.

Acknowledgments: this work was performed in accordance with the state task, state registration No. 041020220006.

For citation: Shelekhova N.V. Express method for the determination of anions in alcoholic beverages based on the CE-CD combination. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 199-215. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11144>

Введение

Органические и неорганические кислоты присутствуют в составе многих алкогольных продуктов и оказывают существенное влияние не только на органолептические характеристики, но и на стойкость при хранении. Важно подчеркнуть, что в настоящее время нормативной документацией на спиртные дистиллированные напитки их анионный состав не регламентирован, что обусловлено малой разработанностью аналитической базы. Данный аспект представляет существенный пробел в научных знаниях об анионном составе многокомпонентных жидких сред, что побуждает исследователей сосредоточиться на этой проблеме [1-6].

В последние десятилетия капиллярный электрофорез (КЭ) становится все более востребованным аналитическим методом для разделения, идентификации и количественного определения широкого круга химических соединений, представляющих значительный интерес в раз-

личных областях применения [7-14]. Метод КЭ получил широкое признание и в области изучения ионного состава пищевой продукции [15-19]. Однако, недостаточная разработанность аналитических методик не позволяет получать более полную информацию об ионном составе спиртных напитков, что затрудняет изучение химического состава продуктов, полупродуктов и отходов спиртового и ликероводочного производства, проведение мониторинга биотехнологических процессов, протекающих при биотрансформации полимеров крахмалистого сырья в этанол, вследствие биокаталитической и биосинтетической конверсии.

Проблемам разработки методик и исследованию состава сложных многокомпонентных объектов, изучению химических процессов бродильных производств посвящены научные труды многочисленных исследователей [20-30]. Острая потребность в разработке методики определения анионного состава спиртных дистиллированных напитков возникла в



связи с необходимостью усовершенствования научно-практических основ комплексной системы контроля и регулирования технологических процессов производства алкогольной продукции, разработанной нами ранее [31]. Кроме того, обосновывая актуальность обсуждаемой тематики, нельзя не отметить огромную значимость разработки надежных и достоверных методик для установления химического состава спиртных напитков, что в полной мере согласуется с государственными программами развития РФ.

Цель исследования: обосновать, разработать и опробовать на реальных объектах высокоэффективную электрофоретическую методику, обеспечивающую экспрессную, высокоточную и достоверную идентификацию и количественное определение анионов неорганических и органических кислот в спиртных напитках.

Экспериментальная часть

Оборудование. Исследования проводили на базе систем капиллярного электрофореза PrinCE 560 и 750 (Нидерланды), Agilent 7100 (США), оснащенных бесконтактным кондуктометрическим детектором TraceDec (Австрия) с пределом детектирования 1×10^{-10} г/см³. Для обработки результатов измерений использовали ПО WPrince Rev.7.1.02.10.01 и ChimStation Rev. B.04.02 SP1[212]. Для взятия точных навесок использовали аналитические весы неавтоматического действия GR200 (Япония) с погрешностью взвешивания не более ± 0.0003 г. Определение водородного показателя проводили на рН-метре HI2002-03 (Германия), оснащенный электродом HI 11310 с точностью измерений ± 0.01 рН. Для приготовления растворов и дозирования проб применяли дозаторы с диапазоном дозирования 0.1-2.5 мкл и 1.0-5.0 см³ и относительной погрешностью не более $\pm 0.8\%$ и $\pm 2.5\%$ соответственно (Финляндия).

Реактивы. Государственные стандартные образцы (ГСО) состава водных рас-

творов ионов с аттестованными значениями массовой концентрации 1 г/дм³ и относительной погрешностью не более 1% при $P=0.95$.

Материалы. Кварцевый капилляр для капиллярного электрофореза длиной 150 см с внешним диаметром 360 мкм, внутренним 50 мкм (Нидерланды).

Образцы и их подготовка к анализу. Объектами исследования служили модельные растворы анионов органических и неорганических кислот, образцы виски, рома, самогона, текилы, бренди.

Обсуждение результатов

Анализ информации литературных и патентных источников показал, что в целях изучения влияния на организм человека нутриентов, содержащихся в дистиллированных спиртных напитках значительный научный и практический интерес представляют важнейшие биогенные элементы, находящиеся в производственных растворах в виде анионов: хлор – в виде хлорид-иона Cl^- , фосфор – в виде фосфат-иона PO_4^{3-} , сера – в виде сульфат-иона SO_4^{2-} , азот – в виде аниона NO_3^- . В целях изучения биотехнологических аспектов бродильных производств, процессов выдержки спиртных дистиллированных напитков в контакте с древесиной дуба, химической сущности осадкообразования и помутнений, а также других процессов, протекающих в ходе производства дистиллированных напитков, особый интерес представляют кислоты, являющиеся промежуточными продуктами цикла Кребса, в том числе: щавелевая, муравьиная, фумаровая, винная, яблочная, лимонная, янтарная, гликолевая, уксусная, молочная, присутствующие в производственных растворах в виде анионов органических кислот: оксалатов, формиатов, фумаратов, тартратов, малаатов, цитратов, сукцинатов, гликолятов, ацетатов, лактатов. Таким образом, в ходе теоретических исследований сформулирован перечень из 16 целевых аналитов для идентификации и разработаны



модельные растворы, содержащие индивидуальные растворы ионов и их смеси в диапазоне массовых концентраций от 0.10 до 20.0 мг/дм³. Выбор целевых ионов обусловлен высоким научно-практическим интересом, проявляемым технологами и нутрициологами к анионному составу спиртных напитков.

Среди значительного разнообразия методов, используемых в аналитической практике, для разработки методики определения анионного состава дистиллированных спиртных напитков, как наиболее подходящий, был выделен метод капиллярного электрофореза (КЭ), что обусловлено, в первую очередь, его высокой эффективностью, экспрессностью и эргономичностью, а также применимостью различных вариантов детектирования. Метод СЕ основан на разделении заряженных компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. В основе метода лежат электрокинетические явления – электромиграция ионов и других заряженных частиц и электроосмос [15-17].

Одним из ограничений КЭ с УФ-детектированием по сравнению с ВЭЖХ, является невысокая чувствительность из-за малой длины оптического пути, равного внутреннему диаметру капилляра. Однако, этот недостаток можно преодолеть за счет использования других видов детектирования [15]. С учетом вышеизложенного, для регистрации электрофореграмм, был выбран бесконтактный кондуктометрический детектор проводимости (КД), состоящий из ячейки и интерфейса, соединяющего ячейку с устройством для записи аналитического сигнала. В основе работы КД лежит измерение электропроводности раствора, пропускаемого через капилляр, проходящий внутри ячейки детектора.

Известно, что подвижность ионов определяется их степенью диссоциации в буферном растворе, и, следовательно,

значением рН. При нейтральных и щелочных значениях рН возникает сильный электроосмотический поток, который движет ионы разделяющего буфера в сторону катода [15-17]. Исследование селективности целевых ионов в зависимости от величины рН проводили на модельных растворах с использованием буферных растворов со значениями водородного показателя в интервале от 2.0-7.0 рН. Максимальную интенсивность аналитического сигнала детектора наблюдали при рН 5.5 буферного раствора.

Первоначально для приготовления буферного раствора использовали гистидин (HIS) и 2-(N-Морфолино)этансульфоновую кислоту (MES). В ходе экспериментов обнаружены искажения аналитического сигнала, выявлены хроматографические наложения и группы неполного разделения пиков. Варьирование соотношением концентраций электролитов в буферных растворах оказывало влияние на хроматографическое поведение целевых анионов, однако не позволяло добиться необходимого разрешения, при котором возможно проведение не только идентификации, но и количественного определения. Наиболее трудно разделимой оказались критическая пара пиков формиаты/фториды. Введение в состав буферного раствора неионного поверхностно-активного вещества Triton X-100 заметно сказалось на селективности разделения и позволило добиться необходимой полноты разрешения критической пары пиков формиаты/фториды, не менее чем 1/2.

В результате проведенных исследований найдена оптимальная композиция буферного раствора: 0.2М HIS, 0.2 MES, 1% Triton X-100, особо чистая вода, рН 5.5. Основными критериями выбора являлись минимальный дрейф нулевой линии и максимальное разрешение хроматографических пиков. Дрейф нулевой линии, определяли как максимальное смещение среднего положения нулевой линии в течение 100 мин после выхода системы капиллярного электрофореза на рабочий



режим, составлял не более $1 \cdot 10^{-2}$ уровень флуктуационных шумов - не более $1 \cdot 10^{-4}$.

Для разделения целевых ионов был выбран немодифицированный полый капилляр из высокочистого плавленого кварца с внешним полиимидным покрытием с внешним диаметром 360 мкм, внутренним диаметром 50 мкм и общей длиной 150 см. Полиимидный слой на концах кварцевого капилляра перед установкой удаляли выжиганием. Серией опытов установлено, что использование капилляра длиной более 100 см приводит к уширению полос образца и увеличению времен миграции определяемых ионов, что, по-видимому, связано с ослаблением электрического поля. Уменьшение длины капилляра до 80 см положительно влияло на эффективность разделения и снизило время анализа до 10 мин. Дальнейшее уменьшение длины приводило к хроматографическим наложениям и неполному разделению пиков.

На следующем этапе исследований испытывали различные варианты режимных параметров системы капиллярного электрофореза. Высокое напряжение, подаваемое на электроды, программировали в интервале +10 кВ...+30 кВ, при этом, контролировали значение силы тока в капилляре во время анализов, как показателя изменения буферной емкости. Известно, что оптимальная сила тока при реализации метода капиллярного электрофореза, обычно не превышает 50 мкА, максимально допустимая составляет 250 мкА. Значительная сила тока может приводить не только к нагреванию, но и к кипению буферного раствора, появлению пузырьков газа и прерыванию электрической цепи [19].

В ходе исследований при напряжении +10 кВ была зафиксирована сила тока равная 1.4 мкА. При этом, наблюдали асимметричные пики целевых ионов с размытым тылом и уменьшение разрешения, что могло быть вызвано размыванием полос образца в колонке. Время анализа – 25 мин. При увеличении напряжения до

+15 кВ сила тока зарегистрирована на уровне 2.1 мкА, значимых улучшений отмечено не было. При увеличении напряжения до +20 кВ сила тока составила 2.8 мкА, форма пиков значительно улучшилась, время анализа составило 18 мин. Оптимальным оказалось напряжение +30 кВ, подаваемое на электроды, при этом максимальная сила тока составляла 4.2 мкА, время анализа составляло 9 мин.

Вопрос о влиянии температуры термостатирования на эффективность и селективность разделения в КЭ все еще остается предметом оживленных дискуссий. Традиционно, отведение Джоулева тепла в системах капиллярного электрофореза реализуют за счет воздушного или водяного охлаждения. Технические характеристики выбранных для проведения настоящего исследования систем капиллярного электрофореза позволяли устанавливать температурные параметры как выше, так и ниже температуры окружающей среды, что оказалось возможным за счет использования производителями оборудования термоэлектрического преобразователя, принцип действия которого основан на эффекте Пельтье.

Опыты по варьированию температуры термостата капилляра проводили в диапазоне от +15 до +30°C, температуры поддона с буферным раствором и образцами в диапазоне от +10 до +35°C. Установлено, что изменение температуры поддона автосэмплера и термостата колонки сказывалось на временах удерживания и разрешении хроматографических пиков. Найдены лучшие параметры термостатирования, обеспечивающие достаточное разделение и чувствительность составляли: для поддона автосэмплера +25°C, для термостата колонки +25°C. Повышение температуры до +30°C, по-видимому, оказывает влияние на вязкость и электропроводность буферного раствора, что приводит к смещению вре-

мен миграции ионов, нестабильности нулевой линии, появлению шумов и искажению формы пиков.

Изучена зависимость относительных времен миграции анионов органических и неорганических кислот от их массовых концентраций. Эффективность разделения по целевым анализам наблюдали при изменении их содержания в диапазоне 0.10-20.0 мг/дм³. Дальнейшее увеличение концентраций до 50-100 мг/дм³ приводило к уширению оснований пиков, вследствие закономерного размывания электрофоретических зон. Найденная зависимость не противоречит, и в полной мере согласуется с известными литературными данными о хроматографических процессах и явлениях. На основании анализа экспериментальных данных установлен диапазон измеряемых массовых концентраций определяемых ионов от 0.1 до 20.0 мг/дм³.

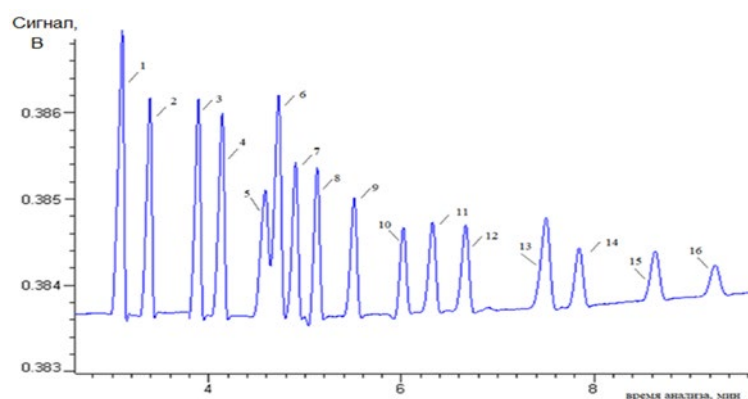
Одной из проблем, возникающих при реализации аналитических методов является воспроизводимый ввод малых объемов пробы. Обычно, при реализации метода капиллярного электрофореза, вводимый объем не превышает нескольких нанолитров. Важно отметить, что большие объемы уменьшают эффективность разделения за счет перегрузки. В ходе исследований испытано два варианта ввода пробы: электрокинетический и гидродинамический. Установлено, что целях повышения точности анализа предпочтительнее гидродинамический ввод пробы, который не только не нарушает состав образца, в отличие от электрокинетического ввода, но и является более воспроизводимым. Подобраны оптимальные параметры гидродинамического ввода: время ввода пробы 20 с, давление от 40 мБар.

Известно, что при использовании кварцевых капилляров возникает ряд проблем вследствие адсорбции различных загрязнений на внутренней поверхности капилляра, нарушающих структуру диффузного слоя, что приводит

к снижению скорости электроосмотического потока, отсутствию стабильности нулевой линии и увеличению времен миграции анализируемых ионов [15-17]. В целях предотвращения адсорбции компонентов анализируемой пробы на стенке капилляра обычно применяют метод промывок.

Состав промывочных растворов и алгоритм промывок подбирали экспериментально, основываясь на результатах ранее проведенных собственных исследований и практического опыта реализации метода КЭ, а также предполагаемой природе загрязняющих компонентов. Варьировали концентрации промывочных растворов, прилагаемое давление, продолжительность промывок. Установлено, что промывку капилляра целесообразно проводить при постоянном давлении 2000 мБар. При подготовке нового капилляра к работе лучшей является следующая схема: первоначально капилляр промывают 1М раствором NaOH в течении 300 мин, затем деионизованной водой в течении 30 мин и рабочим электролитом 300 мин.

Согласно данным научных источников, времена миграции могут являться маркером кондиционного состояния капилляра. Экспериментально подтверждено, что увеличение воспроизводимости параметров миграции и селективности разделения анионов может быть достигнуто за счет использования специальной схемы промывки капилляра. В ходе исследований предложена и отработана схема промывки для регенерации загрязненного капилляра. Сначала промывку проводили деионизованной водой в течении 10 мин, затем 1М раствором NaOH 60 мин. Последующую промывку деионизованной водой 20 мин. выполняли с целью удаления остатков щелочи. Затем промывали 1 М раствором HCl в течении 30 мин и деионизованной водой 20 мин. Финишную промывку для кондиционирования поверхности капилляра



1 – хлориды, 2 – нитраты, 3 – сульфаты, 4 – оксалаты, 5 – формиаты, 6 – фториды, 7 – фумараты, 8 – тарtratoы, 9 – малаты, 10 – цитраты, 11 – сукцинаты, 12 – гликоляты, 13 – ацетаты, 14 – лактаты, 15 – фосфаты, 16 – бензоаты

Рис. 1. Электрофореграмма модельного раствора анионов неорганических и органических кислот

Fig. 1. Electropherogram of a model solution of anions of inorganic and organic acids

проводили буферным раствором в течение 180 мин. Экспериментальная проверка предложенного алгоритма процедур подготовки капилляра к работе, как в случае с новым, так и при регенерации загрязненного капилляра, продемонстрировала высокую эффективность.

Таким образом, в результате проведенных исследований, разработана схема промывки капилляра, изучено влияние ряда параметров на правильность и воспроизводимость разделения, найдены оптимальные режимы работы системы капиллярного электрофореза, обеспечивающие одновременное селективное разделение 16 анионов за 10 мин (табл.1).

С применением подобранных условий получены электрофореграммы модельной смеси анионов неорганических и органических кислот с концентрацией 0.1, 1.0, 5.0, 10 и 20 мг/дм³. В качестве иллюстрации представлена электрофореграмма модельного раствора МР2 (рис.1).

Показано, что пики, зарегистрированные при выбранных параметрах, симметричны, имеют форму гауссовой кривой, соотношение высоты пика к уровню шума не менее 2:1, полноту разрешения – не менее, чем 1/2 от высоты пика. Следует подчеркнуть, что в случае с гауссовыми кривыми высота пика также может

отражать относительное содержание вещества в пробе. На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что данное направление исследований перспективно для развития в векторе количественного определения целевых ионов. Количественный анализ основан на измерении площадей или высот пиков. Некоторые исследователи полагают, что при стабильности условий обнаружения, высота пика может рассматриваться как определяющий параметр для пика, другие считают площади пиков достаточным параметром для количественного определения.

В ходе настоящего эксперимента проведена серия опытов на модельном растворе МР2, в результате которых рассчитаны воспроизводимость времен удерживания, площадей и высоты пиков. Анализ полученных экспериментальных данных подтвердил стабильность времен удерживания целевых анионов. Установлено, что максимальное отклонение показателя «время удерживания» составляет не более 0.6% (рис.2).

В ходе исследований получены экспериментальные данные (рис. 3), подтвер-

Таблица 1. Параметры работы системы капиллярного электрофореза для определения анионов органических и неорганических кислот в спиртных дистиллированных напитках
 Table 1. Operating parameters of the capillary electrophoresis system for the determination of anions of organic and inorganic acids in distilled alcoholic beverages

Параметр	Интервал варьирования	Выбранные параметры
Длина капилляра	60...150 см	80 см
Давление промывки капилляра	250-2500 мБар	2000 мБар
Напряжение на электроды	+10 ...+30 кВ	+20 кВ
Температура термостата капилляра	+15 °С ... +35°С	24°С
Температура поддона с буферным раствором и образцами	+10 °С... +30 °С	24°С
Ввод пробы	электрокинетический / гидродинамический	гидродинамический
Давление ввода пробы	10 ... 40 мБар	30 мБар
Время ввода пробы	10 ...100 с	25с
Детектирование	кондуктометрическое	кондуктометрическое
Время анализа	5...20 мин	10 мин
Ведущий электролит	0.1-1.0 М HIS, 0.1-1.0 MES, 0.5-2% Triton X-100	0.2М HIS, 0.2 MES, 1% Triton X-100

ждающие стабильность показателя «высота пиков». Установлено, что максимальное отклонение по показателю «высота пика» составляет не более 3.3 %.

Обработка и анализ экспериментальных данных по показателю «площадь пика» позволяет сделать вывод о стабильности на протяжении 10 опытов. Максимальное отклонение показателя «площадь пика» составляет не более 4.1% (рис. 4).

Таким образом, на основании вышеизложенного можно заключить, что показатели «площадь пика» и «высота пика» приемлемы для расчета массовых концентраций целевых анионов в диапазоне массовых концентраций от 0.1 до 20.0 мг/дм³.

Исследование зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого иона в модельном растворе проводили пределах предполагаемой аналитической области методики в диапазоне от 0.1-20.0 мг/дм³. Для построения градуировочной кривой готовили 5 уровней модельных растворов, массовой концентрацией 0.1 мг/дм³, 1.0, 5.0, 10.0, 20 мг/дм³, которые соответствовали началу, середине и концу диапазона определений.

Экспериментально доказано, что градуировочные графики для целевых анионов в координатах концентрация-площадь пика обладают линейной зависимостью в диапазоне 0.1-20.0 мг/дм³. Коэффициент корреляции R² составляет не менее 0.99.

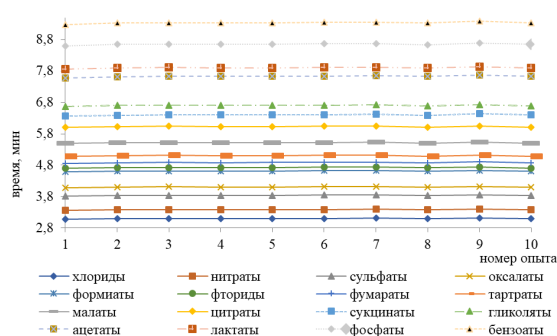


Рис. 2. Времена удерживания целевых анионов
 Fig. 2. Retention times of target anions

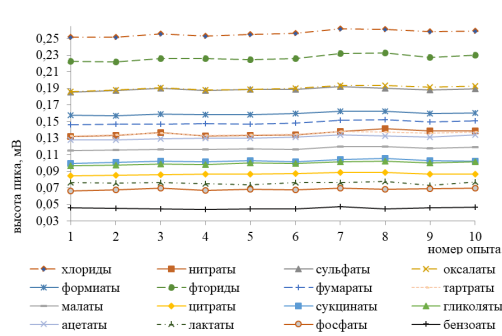


Рис. 3. Высота пиков
 Fig. 3. Peak height

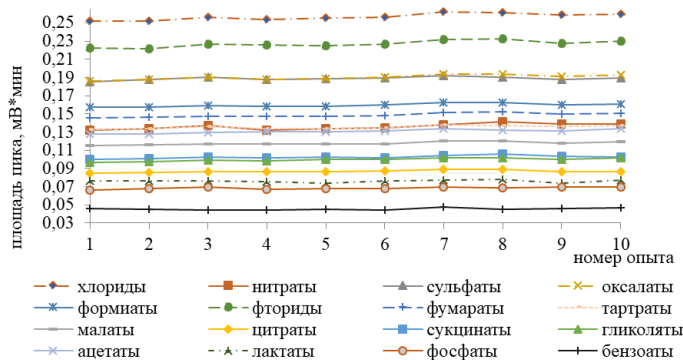


Рис. 4. Площади пиков
 Fig. 4. Peak areas

Одной из важнейших валидационных характеристик методики является ее специфичность, то есть возможность определения целевых аналитов при наличии в пробе типичных мешающих минорных компонентов. При этом, точность результатов анализа в целом и ее отдельные составляющие, правильность и воспроизводимость, могут сильно изменяться в зависимости от состава образца.

В целях выявления взаимосвязи между матрицей образца и идентификацией целевых ионов исследовали специфичность методики, анализируя пробы различных спиртных напитков в нескольких повторностях. Анализ полученных хроматограмм показал, что матрица пробы не препятствует хроматографическому разделению и идентификации целевых аналитов, случаи наложения пиков и артефакты не обнаружены. Результаты экспериментов подтвердили пригодность методики для количественного определения анионного состава спиртных дистиллированных напитков. Установлено, что

границы относительной погрешности методики при $P=0.95$ в диапазоне измеряемых массовых концентраций от 0.1 до 10.0 мг/дм³ составляют не более 25%, в диапазоне свыше 10.0 до 20.0 мг/дм³ не более 18%, показатель воспроизводимости 14 и 11%, показатель повторяемости ОСКО 6 и 9% соответственно.

Разработанная методика апробирована на реальных образцах спиртных напитков, приготовленных на основе дистиллятов: в том числе на виски, роме, текиле, чаче, бренди и самогоне. В ходе исследований сформулированы практические рекомендации по количественному определению анионов. Идентификацию определяемых ионов проводили по времени удерживания, количественное определение методом абсолютной градуировки. Образцы анализировали в двух повторностях в условиях повторяемости. Если обнаруживали, что массовая концентрация иона находится выше границы диапазона измерений, образец разбавляли деионизованной водой, но не более, чем в 10 раз.

Таблица 2. Результаты исследования анионного состава рома, текилы, чачи, бренди, самогона методом КЭ-КД

Table 2. The results of the study of the anionic composition of rum, tequila, chacha, brandy, moonshine by the CE-CD method

Аналит, мг/дм ³	Ром Havana Club (Куба)	Olmeca Tequila Blanco (Мексика)	Chacha Premium Saperavi Muscat (Грузия)	Бренди Vecchia Romagna (Италия)	Самогон Самогонь с медом и перцем (Беларусь)
хлориды	1.03±0.21	0.50±0.10	52.74±9.50	1.11±0.22	2.94±0.59
нитраты	менее 0.1	менее 0.1	0.40±0.08	2.94±0.56	1.19±0.23
сульфаты	не обнаружено	0.86±0.17	17.59±3.17	4.36±0.87	2.38±0.47
оксалаты	1.34±0.27	менее 0.1	не обнаружено	2.13±0.43	менее 0.1
формиаты	40.77±7.34	13.47±2.43	0.32±0.06	12.80±2.30	0.10±0.02
фториды	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	менее 0.1
фумараты	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	0.70±0.14	0.10±0.02
тартраты	0.65±0.13	не обнаружено	не обнаружено	2.14±0.43	не обнаружено
малаты	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	3.83±0.77	0.10±0.02
цитраты	не обнаружено	не обнаружено	13.80±2.48	0.96±0.19	не обнаружено
сукцинаты	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	0.82±0.16	0.10±0.02
гликоляты	35.45±6.38	35.45±6.38	не обнаружено	1.26±0.25	менее 0.1
ацетаты	не обнаружено	117.33±21.12	115.56±20.8	46.77±8.42	15.36±2.76
лактаты	не обнаружено	9.96±1.99	не обнаружено	17.31±3.12	6.72±1.34
фосфаты	12.70±2.29	не обнаружено	7.79±1.56	3.01±0.60	не обнаружено
бензоаты	5.70±1.14	13.10±2.36	не обнаружено	не обнаружено	0.48±0.10

Результаты исследований анионного состава спиртных напитков, приготовленных на основе дистиллятов, представлены в таблицах 2-3.

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что исследованные образцы спиртных дистиллированных напитков значительно отличаются друг от друга по содержанию анионов органических и неорганических кислот. Наиболее значительные различия выявлены в образцах Olmeca Tequila Blanco и Chacha Premium Sa-

peravi Muscat, что можно объяснить особенностями технологии производства, так и видом используемого сырья: для приготовления текилы используют сок голубой агавы, для приготовления чачи - гроздь винограда с гребнями. В образце чачи обнаружена наибольшая массовая концентрация хлоридов, что, по-видимому, связано с химическим составом винограда, который, как известно, зависит не только от сорта, но и от климата, состава почвы произрастания и метеороло-

Таблица 3. Результаты исследования анионного состава виски различного географического происхождения методом КЭ-КД

Table 3. The results of the study of the anionic composition of whiskey of different geographical origin by the CE-CD method

Аналит, мг/дм ³	Виски Lam- bron Castle (Армения)	Виски IBEX (Россия)	Виски Scot- tish Land (Шотландия)	Виски Tulla- more Dew (Ирландия)	Виски Iwai Tradition (Япония)
хлориды	5.58±1.11	3.65±0.73	0.76±0.15	0.58±0.15	0.54±0.14
нитраты	1.95±0.39	1.11±0.22	менее 0.1	0.51±0.13	0.19±0.05
сульфаты	4.05±0.81	4.36±0.87	0.83±0.16	0.29±0.07	0.71±0.18
оксалаты	0.55±0.11	0.28±0.06	1.07±0.21	0.94±0.23	1.35±0.34
формиаты	3.60±0.72	6.92±1.38	9.58 ±1.9	12.40±3.10	13.53±3.38
фториды	0.39±0.08	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
фумараты	менее 0.1	не обнаружено	0.10 ±0.02	не обнаружено	0.77±0.19
тарtrato	не обнаружено	1.87±0.37	4.24±0.84	1.05±0.26	1.56±0.39
малаты	0.25±0.05	1.07±0.21	1.26±0.25	0.84±0.21	не обнаружено
цитраты	0.65±0.13	0.29±0.06	0.36±0.07	не обнаружено	не обнаружено
сукцинаты	0.11±0.02	2.81±0.56	1.08±0.21	0.78±0.20	не обнаружено
гликоляты	2.41±0.48	2.27±0.45	6.01±1.20	8.86±2.22	8.91±2.23
ацетаты	9.70±1.94	менее 0.1	75.29±18.82	не обнаружено	70.60±17.65
лактаты	2.92±0.58	не обнаружено	4.81±0.96	не обнаружено	6.51±1.63
фосфаты	2.84±0.57	0.50±0.10	1.83±0.37	3.40±0.85	5.51±1.38
бензоаты	не обнаружено	2.36±0.47	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено

гических условий года. Кроме того, в образцах текилы и чачи, по сравнению с остальными исследованными образцами, найдено повышенное содержание ацетатов 117.33 и 115.56 мг/дм³ соответственно, которые оказывают негативное влияние на органолептические свойства напитков, придавая им неприятный аромат и жгучий вкус.

В производстве рома в качестве исходного сырья используют либо тростниковый сок, либо мелассу – отход сахарно-тростникового производства. Меласса является трудно сбраживаемым сырьем, поэтому, в технологии используют расы осмофильных дрожжей, способные выдерживать значительные концентрации

сухих веществ в среде. Некоторые производители используют собственные производственные культуры, адаптированные к конкретным условиям сбраживания, характерным для данного предприятия. Содержание формиатов 40.77 мг/дм³ и гликолятов 35.45 мг/дм³ в образце рома Navana Club может быть обусловлено не только отличиями в сырье, но и особенностями метаболизма дрожжей сахармицетов, используемых в процессе спиртового брожения. Повышенная концентрация фосфатов 12.70 мг/дм³, косвенно объясняется известными научными данными о введении фосфорного питания для дрожжей в ходе технологического процесса сбраживания мелассы.

Фториды массовой концентрацией менее 0.1 и 0.39 мг/дм³ обнаружены в образце самогона СамОгонь с медом и перцем и виски Lambton Castle, что, по всей вероятности, связано с особенностями состава технологической воды, используемой для приготовления напитков. Виски Lambton Castle, IBEX и Scottish Land в целом, показали сопоставимые результаты.

Повышенное содержание ацетатов 70.60 и 75.29 мг/дм³ в виски Iwai Tradition (Япония) и Scottish Land (Шотландия) соответственно, может быть объяснено особенностями технологии производства – длительной выдержкой в дубовых бочках. Следует отметить, что классические технологии приготовления виски подразумевают выдержку висковых дистиллятов в бочках из американского и французского дуба, однако, виски Iwai Tradition выдерживают в бочках из японского дуба. Известно, что химический состав древесины дубовых бочек может быть обусловлен влиянием условий произрастания дуба, сезона заготовки, анатомической структуры древесины и множеством других факторов, которые, к сожалению, еще недостаточно изучены. Исследованиями, проведенными нами ранее, установлено влияние степени обжига и вида древесины дуба на образование летучих органических примесей и катионов в этанольных растворах [20].

В образцах виски Tullamore Dew и Iwai Tradition обнаружены наиболее высокие массовые концентрации формиатов 12.40 и 13.53 мг/дм³ соответственно. Известно, что муравьиная кислота синтезируется дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* при биосинтетической конверсии полимеров зернового сырья, где пируват окисляется до формиата и других побочных метаболитов [32-34]. Кроме того, согласно литературным данным, муравьиная кислота может образоваться и непосредственно при термическом распаде веществ древесины.

Полученные в ходе настоящего исследования экспериментальные данные согласуются с общепринятыми теоретическими представлениями и сведениями о составе спиртных дистиллированных напитков, полученных с применением методов мокрой химии. Внедрение разработанной аналитической процедуры одновременного определения анионов органических и неорганических кислот методом капиллярного электрофореза с кондуктометрическим детектированием в практику технологического контроля бродильных производств позволит генерировать новые знания о химических превращениях, происходящих в ходе биотехнологических и технологических процессов производства спиртных дистиллированных напитков и получить продукт с заданными свойствами.

Заключение

Изучены аналитические возможности метода капиллярного электрофореза с гидродинамическим вводом пробы и кондуктометрическим детектированием для идентификации анионов в спиртных напитках. Подобраны режимы работы системы капиллярного электрофореза и композиция электролитов буферного раствора, обеспечивающие одновременное селективное определение 16 анионов органических и неорганических кислот в спиртных напитках за 10 мин.

Разработана методика определения хлоридов, нитратов, сульфатов, оксалатов, формиатов, фторидов, fumarатов, тартратов, малатов, сукцинатов, гликолятов, ацетатов, лактатов, фосфатов, бензоатов на уровне статистически значимых концентраций в диапазоне от 0.10 до 20.0 мг/дм³. Установлено, что границы относительной погрешности методики измерений не превышает 25%. Разработанная методика опробована на реальных объектах. Полученные данные хорошо согласуются с известными данными, полученными методами мокрой химией. Сделан вывод о пригодности методики



для анализа анионного состава спиртных дистиллированных напитков.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет из-

Список литературы

1. Рудаков О.Б., Никитина С.Ю. Тренды в аналитическом контроле качества питьевого этанола. // *Аналитика и контроль*. 2017. Т. 21, № 3. С. 180-196.
2. Kamentsev M.Y., Yakimova N.M., Moskvina L.N. Expansion of Analytical Possibilities of Capillary Electrophoresis in Chemical Technological Control. // *J Anal Chem*. 2019. Vol. 74. P. 1135-1139.
3. Buglass A.J. Handbook of alcoholic beverages: Technical, analytical and nutritional aspects. John Wiley & Sons; 2011. 1208 p.
4. Wanikawa A., Sugimoto T.A. Narrative Review of Sulfur Compounds in Whisk(e)y // *Molecules*. 2022. Vol. 27(5). P. 1672.
5. Gregorio Castañeda, Juana Rodríguez-Flores, Angel Ríos Analytical approaches to expanding the use of capillary electrophoresis in routine food analysis // *Journal of Separation Science*. 2005. Vol. 28, no 9-10. P. 915-924.
6. Martínková E., Křížek T., Coufal P. Determination of nitrites and nitrates in drinking water using capillary electrophoresis. // *Chem. Pap*. 2014. Vol. 68. P. 1008-1014.
7. Adams F., Adriaens M. The metamorphosis of analytical chemistry. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020. Vol. 412. P. 3525-3537.
8. Kitagawa F., Otsuka K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis // *J. Chrom. A*. 2014. Vol. 1335. P. 43-60.
9. Farsang R, Kovacs Z, Jarvas G, Guttman A. Ultrahigh-Sensitivity Capillary Electrophoresis Analysis of Trace Amounts of Nitrate and Nitrite in Environmental Water Samples // *Separations*. 2022. Vol. 9(11). P. 333.
10. Fukushi K., Tada K., Takeda S., Wakida S., Yamane M., Higashi K., Hiroyuki K. Simultaneous determination of nitrate and nitrite ions in seawater by capillary zone electrophoresis using artificial seawater as the carrier solution // *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 838. P. 303-311.
11. Padarauskas A., Paliulionyte, V., Pranaityte B. (2001). Single-run capillary electrophoretic determination of inorganic nitrogen species in rainwater // *Analytical Chemistry*. 2001. Vol. 73. P. 267-271.
12. Röder A., Bachmann K. Simultaneous determination of organic and inorganic anions in the sub- $\mu\text{mol/l}$ range in rain water by capillary zone electrophoresis // *Journal of Chromatography A*. 1995. Vol. 689. P. 305-311.
13. Polyakova E.V., Shuvaeva O.V., Borisov A.S. Determination of Citrate Ions in Blood Plasma by Capillary Zone Electrophoresis. // *J Anal Chem*. 2018. Vol. 73. P. 906-909.
14. Evtuyugin G.A., Porfireva, A.V. Determination of Organic Compounds in Aqueous-Organic and Dispersed Media Using Electrochemical Methods of Analysis // *Journal of Analytical Chemistry*. 2021. Vol. 76. P. 1131-1143.
15. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб. Веда. 2006. 212 с.
16. Rizzi A Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2001. Vol. 22. P. 3079-3106.
17. Kodama S., Yamamoto A., Aizawa S., Honda Y., Suzuki K., Kemmei T., Taga A., Enantioseparation of α -hydroxy acids by chiral ligand exchange CE with a dual central metal ion system // *Electrophoresis*. 2012. Vol. 33. P. 2920-2924.



18. Kamentsev M.Y., Mamedova S.N., Moskvina L.N., Yakimova N.M. Determination of chloride and sulfate ions in high-purity water by capillary electrophoresis // *J Anal Chem.* 2015. Vol. 70. P. 193-197.

19. Kartsova, L.A., Makeeva, D.V., Besonova, E.A. Current Status of Capillary Electrophoresis. // *J Anal Chem.* 2020. Vol. 75. P. 1497-1513.

20. Шелехова Н.В. Экспресс-метод определения летучих органических примесей в спиртных дистиллированных напитках на основе сочетания ГХ/ПИД и ГХ/МСД. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2022. Т. 22, № 1. С.58-68.

21. Рудаков О.Б., Шелехова Н.В., Рудаков Я.О., Селеменев В.Ф., Харченко Г.Ю. Экспрессное определение метанола в спиртных напитках методом газовой хромато-масс-спектрометрии. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2022. Т. 22, № 2. С. 116-125.

22. Савчук С.А., Нужный В.П., Рожанец В.В. Химия и токсикология этилового спирта и напитков, изготовленных на его основе. Хроматографический анализ спиртных напитков. М. Ленанд. 2017. 184 с.

23. Рудаков О.Б., Шелехова Н.В., Полянский К.К., Селеменев В.Ф. Определение фурфурола в этиловом спирте и водках методом газовой хромато-масс-спектрометрии // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2021. Т. 21, № 6. С. 812-818.

24. Скурихин И.М. Виноделие и виноградарство СССР. 1960. № 1. С. 8-15.

25. Джанполадян Л.М. Сборник трудов Армянского НИИ виноградарства, виноделия и плодоводства. Ереван. 1957. С. 5-19.

26. Личев В.И. Разработка технологии получения экстракта из древесины дуба. М. ЦНИИТЭИ Пищепром. 1977. 40с.

27. Барановская В.Б., Медведевских М.Ю., Карпов Ю.А. Актуальные проблемы качества химического анализа. //

Аналитика и контроль. 2021. Т. 25, № 4. С. 273-279.

28. Валидация аналитических методов: пер. с англ. яз. 2-го изд. под ред. Г.Р. Нежиховского. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: пер. с англ. яз. 3-го изд. под ред. Р.Л. Кадиса. Руководства для лабораторий. СПб.: Профессия. 2016. 312 с.

29. Ramsey M.H., Ellison S.L.R., Roston P. Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches. Second Edition, Eurachem. 2019. 120 p.

30. Mosulishvili L.M., Barnov V.A., Tsibakhashvili N.Y., Engelhardt H., Beck W. Enhancing Detection Sensitivity in Capillary Electrophoresis. // *J Anal Chem.* 2001. Vol. 56. P. 512-514.

31. Шелехова Н.В., Поляков В.А., Римарева Л.В. Комплексная система контроля производства этилового спирта и спиртных напитков. // *Хранение и переработка сельхозсырья.* 2015. № 12. С. 55-56.

32. Меледина Т.В., Давыденко С.Г. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм. СПб. Университет ИТМО. 2015. 88 с.

33. Manshin D., Meledina T.V., Britvina T., Davydenko S.G., Shelekhova N.V., Andreev V., Andreeva A. Comparison of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulevardii* and top-fermenting brewing yeast strains during the fermentation of model nutrient media and beer wort. // *Agronomy Research this link is disabled.* 2022. Vol. 20(3). P. 625-636.

34. Шелехова Н.В., Шелехова Т.М., Скворцова Л.И., Полтавская Н.В. Определение летучих органических примесей в виски методом газовой хромато-масс-спектрометрии // *Техника и технология пищевых производств.* 2022. Т. 52, № 4. С. 787-796.

References

1. Rudakov O.B., Nikitina S.Yu. Trends in the analytical quality control of drinking ethanol. *Analytics and control.* 2017; 21(3):



- 180-196. <https://doi.org/10.15826/analitika.2017.21.3.010>
2. Kamentsev M.Yu., Yakimova N.M., Moskvina L.N. Expanding the Analytical Capabilities of Capillary Electrophoresis in Chemical Process Control. *J Anal Chem.* 2019; 74: 1135-1139. <https://doi.org/10.1134/S106193481910006X>
3. Buglass A.J. Handbook of alcoholic beverages: Technical, analytical and nutritional aspects. John Wiley&Sons; 2011. 1208 p. <https://doi.org/10.1002/9780470976524>
4. Wanikawa A., Sugimoto T.A. Narrative Review of Sulfur Compounds in Whisk(e)y. *Molecules.* 2022; 27(5):1672. <https://doi.org/10.3390/molecules27051672>
5. Gregorio Castañeda, Juana Rodríguez-Flores, Angel Ríos. Analytical approaches to expanding the use of capillary electrophoresis in routine food analysis. *Journal of Separation Science.* 2005; 28(9-20): 915-924. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500036>
6. Martinková E.; Křížek T.; Coufal P. Determination of nitrites and nitrates in drinking water using capillary electrophoresis. *Chem. Pap.* 2014; 68: 1008-1014. <https://doi.org/10.2478/s11696-014-0548-4>
7. Adams F., Adriaens M. The metamorphosis of analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2020; 412: 3525-3537.
8. Kitagawa F., Otsuka K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2014; 1335: 43-60.
9. Farsang R, Kovacs Z, Jarvas G, Guttman A. Ultrahigh-Sensitivity Capillary Electrophoresis Analysis of Trace Amounts of Nitrate and Nitrite in Environmental Water Samples. *Separations.* 2022; 9(11):333. <https://doi.org/10.3390/separations9110333>
10. Fukushi K., Tada K., Takeda S., Wakida S., Yamane M., Higashi K., Hiroyuki K. Simultaneous determination of nitrate and nitrite ions in seawater by capillary zone electrophoresis using artificial seawater as the carrier solution. *Journal of Chromatography A.* 1999; 838: 303-311. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00214-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00214-9)
11. Padarauskas A., Paliulionyte, V., Pranaityte B. Single-run capillary electrophoretic determination of inorganic nitrogen species in rainwater. *Analytical Chemistry.* 2001; 73: 267-271. <http://dx.doi.org/10.1021/ac000674s10.1021/ac000674s>
12. Roder A., Bachmann K. Simultaneous determination of organic and inorganic anions in the sub- $\mu\text{mol/l}$ range in rain water by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 1995; 689: 305-311. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)00895-G](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(94)00895-G)
13. Polyakova E.V., Shuvaeva O.V., Borisov A.S. Determination of Citrate Ions in Blood Plasma by Capillary Zone Electrophoresis. *J Anal Chem.* 2018; 73: 906-909. <https://doi.org/10.1134/S1061934818090113>
14. Evtyugin G.A., Porfireva, A.V. Determination of Organic Compounds in Aqueous-Organic and Dispersed Media Using Electrochemical Methods of Analysis. *Journal of Analytical Chemistry.* 2021; 76: 1131-1143. <https://doi.org/10.1134/S1061934821100051>
15. Komarova N.V., Kamentsev Ya.S. A practical guide to the use of Capillary capillary electrophoresis systems. St. Petersburg. Veda LLC. 2006. 212 p. (In Russ.)
16. Rizzi A. Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2001; 22: 3079-3106.
17. Kodama S., Yamamoto A., Aizawa S., Honda Y., Suzuki K., Kemmei T., Taga A., Enantioseparation of α -hydroxy acids by chiral ligand exchange CE with a dual central metal ion system. *Electrophoresis.* 2012; 33: 2920-2924.
18. Kamentsev M.Y., Mamedova S.N., Moskvina L.N., Yakimova N.M. Determination of chloride and sulfate ions in high-purity water by capillary electrophoresis. *J Anal Chem.* 2015; 70: 193-197. <https://doi.org/10.7868/S004445021412007X>



19. Kartsova L.A., Makeeva D.V., Besonova E.A. Current Status of Capillary Electrophoresis. *J Anal Chem.* 2020; 75: 1497-1513. <https://doi.org/10.1134/S1061934820120084>
20. Shelekhova N.V. Express method for the determination of volatile organic impurities in distilled alcoholic beverages based on a combination of GC/FID and GC/MSD. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskiye protsessy.* 2022; 22(1): 58-68. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9021> (In Russ.)
21. Rudakov O.B., Shelekhova N.V., Rudakov Ya.O., Selemenev V. F., Kharchenko G. Yu. Express determination of methanol in alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskiye protsessy.* 2022; 22(2): 116-125. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9214> (In Russ.)
22. Savchuk S.A., Nuzhny V.P., Rozhanets V.V. Chemistry and toxicology of ethyl alcohol and drinks made on its basis. Chromatographic analysis of alcoholic beverages. M., Lenand. 2017. 184 p.
23. Rudakov O.B., Shelekhova N.V., Pol'yansky K.K., Selemenev V.F. Determination of furfural in ethyl alcohol and vodkas by gas chromatography-mass spectrometry. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskiye protsessy.* 2021; 21(6): 812-818. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3826> (In Russ.)
24. Skurikhin I.M. Winemaking and viticulture of the USSR. 1960; 1: 8-15. (In Russ.)
25. Dzhanpoladyan L.M. Collection of works of the Armenian Research Institute of Viticulture, Winemaking and Fruit Growing. Yerevan. 1957. P. 5-19.
26. Lichev V.I. Development of extract technology and from oak wood. M. Pishcheprom. 1977. 40 p.
27. Baranovskaya V.B., Medvedevskikh M.Yu., Karpov Yu.A. Actual problems of the quality of chemical analysis. *Analytics and control.* 2021; 25(4): 273-279. <https://doi.org/10.15826/analitika.2021.25.4.005> (In Russ.)
28. Validation of analytical methods: Per. from English. lang. 2nd ed. ed. G.R. Nezhihovsky. Quantitative description of uncertainty in analytical measurements: Per. from English. lang. 3rd ed. ed. R.L. Cadiz. Manuals for laboratories. St. Petersburg: TsOP Professiya, 2016. 312 p.
29. Ramsey M.H., Ellison S.L.R., Roston P. Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches. Second Edition, Eurachem. 2019. 120 p.
30. Mosulishvili L.M., Barnov V.A., Tsibakhashvili N.Y., Engelhardt H., Beck W. Enhancing Detection Sensitivity in Capillary Electrophoresis. *J Anal Chem.* 2001; 56: 512-514 <https://doi.org/10.1023/A:1016616307737>
31. Shelekhova N.V., Polyakov V.A., Rimareva L.V. Integrated control system for the production of ethyl alcohol and spirits. Storage and processing of agricultural raw materials. 2015; 12: 55-56.
32. Meledina T.V., Davydenko S.G. Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Morphology, chemical composition, metabolism. St. Petersburg: ITMO University. 2015. 88 p.
33. Manshin D., Meledina T.V., Britvina T., Davydenko S.G., Shelekhova N.V., Andreev V., Andreeva A. Comparison of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and top-fermenting brewing yeast strains during the fermentation of model nutrient media and beer wort. *Agronomy Research* [this link is disabled.](https://doi.org/10.15159/AR.22.066) 2022; 20(3): 625-636. <https://doi.org/10.15159/AR.22.066>
34. Shelekhova, N.V., Shelekhova, T.M., Skvortsova, L.I., Poltavskaya, N.V. Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Volatile Organic Impurities in Whiskey. *Food Processing: Techniques and Technology.* 2022; 52(4): 787-796. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2406> (In Russ.)



Информация об авторах / Information about the authors

Н.В. Шелехова – д.т.н., заведующая лабораторией хроматографии ВНИИПБТ-филиала ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия

N.V. Shelekhova – doctor of technical sciences, Head of the Laboratory of chromatography, Russian Research Institute of Food Biotechnology is a Branch of Federal Research Center of Food, Biotechnology and Food Safety, Moscow, e-mail: 4953610101@mail.ru

Статья поступила в редакцию 13.12.2022; одобрена после рецензирования 14.03.2023; принята к публикации 22.03.2023.

The article was submitted 13.12.2022; approved after reviewing 14.03.2023; accepted for publication 22.03.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.08:544.72:544.777

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11145

Применение композита поливиниловый спирт – магнетит для повышения точности метода оптической микрометрии

**Хусниддин Рустамович Каримов^{1✉},
Анастасия Владимировна Староверова², Михаил Геннадьевич Токмачев²,
Николай Борисович Ферапонтов², Хамза Турсунович Тробов¹**

¹Самаркандский государственный университет, Самарканд, Узбекистан,

khusniddin_rustamovich@mail.ru[✉]

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация. В основе метода оптической микрометрии (МОМ) лежит зависимость объема сенсора, которым обычно является гранула полимерного геля, от состава раствора, в котором эта гранула находится. Предполагается, что сенсор имеет форму шара, но на практике обычно его форма несколько отличается от шаровидной и имеет форму эллипсоида вращения. Это незначительные отличия, но при вычислениях их желательно учитывать. С этой целью в работе предложено фиксировать положение сенсора в ячейке. В этом случае изменение степени набухания гранулы не сопровождается изменением ее положения в ячейке, и отклонения ее формы от сферической усредняются. Этот результат достигается путем введения в сенсор (гранулу) магнетита и установкой магнита под ячейкой с анализируемым раствором. В работе описан способ получения гранул (сенсоров) на основе сшитого поливинилового спирта (ПВС) с осажденным в них магнетитом. Исследования показали, что в этом случае присутствие магнетита в гранулах не оказывает влияния на их степень набухания. Этот факт подтвердили и исследования кинетики набухания. Кинетика набухания как гранул с магнетитом, так и гранул без него была исследована в растворах несорбирующегося электролита (КС1) и в растворах электролита (MgCl₂), где растворенный электролит образует с полимером координационную связь. Анализ результатов, полученных в работе, позволил сделать по крайней мере два вывода. Во-первых, применение в методе оптической микрометрии в качестве сенсоров гелей с магнетитом практически решает проблему, связанную с поиском гранул сферической формы, необходимых для повышения точности метода. Фиксированное положение гранулы в ячейке позволяет проводить измерения на гранулах в форме эллипсоидов вращения. Во-вторых, показано, что метод оптической микрометрии, укомплектованный указанным в работе оборудованием и материалом, позволяет проводить измерения концентраций анализируемых растворов с точностью 0.4%.

Ключевые слова: полимерный гель, магнетит, композит, степень набухания, кинетика

Для цитирования: Каримов Х.Р., Староверова А.В., Токмачев М.Г., Ферапонтов Н.Б., Тробов Х.Т. Применение композита поливиниловый спирт – магнетит для повышения точности метода оптической микрометрии // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 216-224. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11145>

Original article

Application of composite polyvinyl alcohol – magnetite for increase of the accuracy of optical micrometry method

**Khusniddin R. Karimov^{1✉}, Anastasia V. Staroverova², Mikhail G. Tokmachev²,
Nikolai B. Ferapontov², Khamza T. Trobov¹**

¹Samarkand State University, Samarkand, Uzbekistan, khusniddin_rustamovich@mail.ru[✉]

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation



Abstract. The method of optical micrometry (MOM) is based on the dependence of the sensor volume, which is usually a polymer gel granule, on the composition of the solution in which this granule is located. It is assumed that the sensor has the shape of a ball, but in practice, usually its shape is somewhat different from spherical and has the shape of an ellipsoid of revolution. These are minor differences, but it is desirable to take them into account for calculations. For this purpose, in this study it was proposed to fix the position of the sensor in the cell. In this case, the change in the degree of swelling of the granule is not accompanied by a change in its position in the cell and the deviations of its shape from spherical are averaged. This result is achieved by introducing magnetite into the sensor (granule) and placing a magnet under the cell with the analysed solution. The study describes a method for the formation of granules (sensors) based on cross-linked polyvinyl alcohol (PVA) with magnetite deposited in them. Studies have shown that in this case the presence of magnetite in the granules does not affect their degree of swelling. This fact was also confirmed by studies of swelling kinetics. The swelling kinetics of both granules with magnetite and without it was studied in solutions of a nonsorbable electrolyte (KS1) and in electrolyte solutions ($MgCl_2$), where the dissolved electrolyte forms a coordination bond with the polymer. Analysis of the results obtained in the study allowed to draw at least two conclusions. First, the use of gels with magnetite as sensors in the method of optical micrometry practically solves the problem associated with the search for spherical granules necessary to improve the accuracy of the method. The fixed position of the granule in the cell allows to perform measurements on granules in the form of ellipsoids of revolution. Secondly, it was shown that the method of optical micrometry, supplemented with the equipment and material specified in the study, allows to measure the concentrations of analysed solutions with an accuracy of 0.4%.

Keywords: polymer gel, magnetite, composite, degree of swelling, kinetics.

For citation: Karimov Kh.R., Staroverova A.V., Tokmachev M.G., Ferapontov N.B., Trobov Kh.T. Application of composite polyvinyl alcohol – magnetite for increase of the accuracy of optical micrometry method. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2023. 23(2): 216-224. (In Russ.).* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11145>

Введение

В методе оптической микрометрии (МОМ) [1, 2] полимерные гели используются в качестве чувствительных элементов (сенсоров), которые изменяют свою степень набухания в зависимости от свойств внешнего раствора. Наиболее удобной формой чувствительного элемента, помещаемого в раствор, является форма шара. Она позволяет быстро и достаточно просто вычислять изменение объема чувствительного элемента, которое является функцией свойств анализируемого раствора. Определение состава анализируемого раствора в МОМ проводят как на основании равновесных, так и кинетических данных об изменении степени набухания гранулы в анализируемом растворе. Отметим, что использование кинетических данных значительно расширяет как возможности метода, так и его чувствительность. Кроме того, использование кинетики позволяет определять не только концентрацию, но и природу растворенного вещества [3-10].

Одним из факторов, от которого зависит точность получаемых результатов, является природа чувствительного элемента (сенсора), которым в МОМ является гранула (или гранулы) геля сшитого полимера. Важными характеристиками гранул являются их степень набухания и индифферентное отношение к химическому составу анализируемого раствора. Кроме того, к свойствам таких полимеров предъявляются и другие требования. Во-первых, эти свойства должны воспроизводиться от партии к партии, во-вторых, применяемые гранулы должны иметь сферическую форму, близкую к идеальной, в-третьих, изменение степени набухания при повторных измерениях одного и того же раствора должны воспроизводиться.

Основной проблемой метода, препятствующей точному определению концентрации анализируемого раствора, является отличная от сферической форма сенсоров, так как используемые в методе гранулы практически никогда не имеют точной сферической формы. Чаще всего форма сенсора – это форма эллипсоида

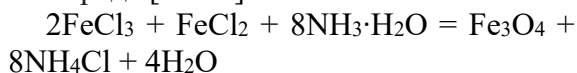
вращения с разными значениями размеров радиусов. При проведении анализа часто происходит изменение положения гранулы в ячейке, а это может приводить к серьезным отклонениям рассчитываемых величин от истинных и заметно снизить точность анализа. Для решения данной проблемы в работе в качестве сенсоров предложено использовать полимерные гели гранул сшитого поливинилового спирта (ПВС) с частицами магнетита и ячейки с установленными под ними магнитами [11]. В этом случае гранула сенсора неподвижно фиксируется на дне ячейки. Эта фиксация позволяет избежать ошибок, появляющихся в связи с влиянием несферической формы гранулы.

В работе проверено влияние присутствия магнетита на равновесные и кинетические свойства геля. В результате проведенных экспериментов было установлено, что степень набухания исследованного в работе геля композита, включающего полимер (ПВС), магнетит и воду в аналогичных условиях соответствует степени набухания такого же геля, но с находящимся в нем магнетитом.

Экспериментальная часть

Получение композита с магнетитом. Используемый в работе композит состоял из сшитого поливинилового спирта (ПВС) в качестве матрицы геля и магнетита. Сшитый полимер получали путем сшивания в щелочной среде линейного ПВС 18/11 эпихлоргидрином (20% ЭХГ) по методике [12] и последующей операцией гранулирования сшитого полимера в реакторе с вазелиновым маслом и с мешалкой при 75°C. После гранулирования гранулы отмывали от масла и помещали в водный раствор солей железа в мольном соотношении $Fe^{2+} : Fe^{3+}$ как 1:2. Приготовленную суспензию помещали в чашку Петри и ставили на верхнюю площадку эксикатора, на дно которого заливали водный раствор аммиака. Этот способ яв-

ляется одним из наиболее простых методов синтеза магнитных частиц посредством химического осаждения в щелочной среде [13-15].



В предлагаемой работе данная методика была реализована в полимерном геле.

Анализ свойств образцов композита с магнетитом. Известно, что магнетит относится к ферромагнетикам, то есть обладает самопроизвольной намагниченностью. Следовательно, о нахождении магнетита в полученных образцах можно судить по наличию электромагнитного взаимодействия полученных гранул с магнетитом. Другим способом анализа, используемым в работе, являлась сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).

Для нахождения массовой доли магнетита по отношению к массе ПВС обезвоженные образцы были взвешены, а затем прокалены в муфельной печи при температуре 700°C в течение 2 часов. Температуру и время обжига определяли в соответствии с данными из [16]. После прокаливания образцы вновь были взвешены. Было установлено, что в результате интенсивного выделения коксовых газов в некоторых бюксах произошла потеря массы основного продукта, поэтому приводимый результат является полуколичественным. С учетом указанных потерь массовая доля магнетита в гранулах составляла 60-65%.

Обсуждение результатов

В зависимости от поставленной задачи исходный объем гранулы геля может изменяться от нескольких десятков до нескольких сотен кубических микрон, но при равновесии он является величиной постоянной для раствора данного состава. Причина изменения степени набухания (объема) геля связана с изменением состава внешнего раствора. Если изменение измеряемого объема происходит в

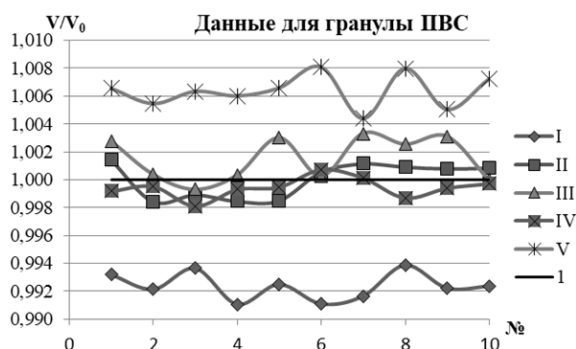


Рис. 1. Изменение степени набухания гранулы полимерного геля от номера фотографии в каждой десятке (точки). 1 – гранула сравнения. I-II-III-IV-V – гранулы которые взяты для исследования.

Fig. 1. Change in the degree of swelling of the polymer gel granule from the photograph number in each ten samples (points). 1 – comparison granule. I-II-III-IV-V – granules used for research.

Таблица 1. Статистические характеристики данных, приведенных на рис.1.

Table 1. Statistical characteristics of the data shown in Fig. 1.

Десятки	I	II	III	IV	V	Суммарные данные
Среднее	0.9924	1	1.0015	0.9994	1.0064	0.9999
Медиана	0.9923	1.0007	1.0015	0.9994	1.0064	1.0002
СКО*	0.001	0.0013	0.0016	0.0007	0.0012	0.0047
Размах	0.0028	0.003	0.004	0.0026	0.0037	0.0170
Макс	0.9939	1.0014	1.0033	1.0007	1.0081	1.0081
Мин	0.9911	0.9984	0.9993	0.9981	1.0044	0.9911
Число фотографий N	10	10	10	10	10	50

растворе постоянного состава, то причиной этого является ошибка измерения, что чаще всего связано с несферической формой гранулы.

В МОМ существуют два типа ошибок, влияющих на точность анализа, – это погрешность прибора и ошибки, связанные с геометрией формы гранул. Для определения приборной погрешности в работе были проанализированы результаты фотографирования пяти гранул, диаметр каждой из которых порядка 1 мм.

В первой серии снимков гранулы находились в воде. Не изменяя их положения, были сделаны по десять фотографий каждой гранулы. Фотографирование проводили с помощью видеокамеры Selestron 44421, размер линейки 5 мм пикс/мм, с разрешением 750 пикселей/мм. Полагая, что ошибку определения диаметра гранулы по фотографии в 1 пиксель, прихо-

дим к априорной оценке ошибки определения объема гранулы в 0.4%. После обработки экспериментальных результатов было установлено, что вычисленные по фотографиям объемы гранул в каждом десятке колеблются в пределах именно 0.4%. Таким образом, в результате влияния погрешности самого прибора, оценка значения объема гранулы, находящейся в неподвижном состоянии, может колебаться в указанном диапазоне.

Затем для учета влияния изменения положения гранул планшет с ячейками вместе с гранулами встряхивали и делали еще по 10 фотографий каждой гранулы. Было установлено, что после встряхивания измеряемые размеры гранул заметно изменялись. Это однозначно говорит о том, что форма таких гранул отличалась от шарообразной. Для сопоставления степени изменений объемов гранул разного размера использовали величины относи-

тельных объемов V_i/V_0 . В качестве величины V_0 брали среднее значение объемов каждой гранулы из первой серии, а в качестве величины V_i - измеряемый объем анализируемой гранулы. Обработка данных показала, что для гранул, чья форма отличается от сферической, оценка значения определяемого объема может колебаться в диапазоне 2.0%. В качестве иллюстрации приведены результаты фотографирования одной гранулы (рис. 1). Сначала, не изменяя положения гранулы, были сделаны десять ее фотографий (кривая 1), затем гранулу вместе с ячейкой встряхнули и сделали еще десять фотографий той же гранулы (кривая 2). Далее аналогичным способом были получены фотографии кривых 3, 4 и 5, которые иллюстрируют изменение размеров все той же гранулы, находящейся в разных положениях относительно объектива микроскопа.

Различное расположение кривых – следствие неправильной формы гранулы и, соответственно, разного положения гранулы в ячейке.

В результате установлено, что, во-первых, полученные после обработки размеры гранулы в каждом десятке, то есть размеры гранулы в неподвижном состоянии колеблются в пределах 0.4 %. Во-вторых, хорошо видно, что после встряхивания измеряемые размеры гранул заметно изменяются. Следовательно, формы измеряемых гранул не шарообразные, поэтому после встряхивания принимаемое ими положение в ячейке, отличается от предыдущего. Из обработанных данных следует, что в результате несферичности формы гранул оценка значения их объема в данном случае может колебаться в диапазоне 2.0%. В таблице 1 приведены статистические характеристики полученного набора данных.

Влияние магнетита на поведение гранул геля ПВС. Для оценки влияния гранул с магнетитом, одну из них помещали в ячейку, заполненную водой, под кото-

рой был установлен магнит. Выдерживали гранулу в воде некоторое время для достижения равновесного состояния. При этом находящаяся в ячейке гранула была неподвижно зафиксирована на дне ячейки. Затем ячейку переносили на столик микроскопа. Не вынимая гранулу из ячейки под микроскопом делали 10 фотографий. На основании этих снимков находили величину V_0 , исходное значение ее объема. Для определения отклонений, вызванных отличной от сферической формы гранулы, взбалтыванием пытались изменить положение гранулы в ячейке и проводили повторную съемку (еще 10 снимков), и затем повторяли данную процедуру еще три раза. В результате было сделано 50 фотографий гранулы или 5 серий из 10 подряд идущих фотографий. Таким образом была получена информация о поведении гранулы с магнетитом в воде (рис. 2, табл. 2).

При фотографировании было установлено, что при встряхивании в воде гранулы с магнетитом ее объем (в пределах чувствительности прибора) сохраняется постоянным. Значит отклонения объемов гранулы с магнетитом от среднего не превышают 0.4%, что составляет погрешность прибора. Таким образом было показано, что в случае использования гранул с магнетитом, снимается необходимость точного соблюдения сферической формы гранулы, так как фотографирование гранулы с магнетитом дает результат, аналогичный тому, что был получен для обычной гранулы, фотографируемой в неподвижном состоянии.

Дальнейшая проверка влияния присутствия магнетита на поведение геля ПВС в растворах разного состава была осуществлена путем сравнения результатов кинетики набухания гранул геля ПВС с магнетитом и без него в растворах хлоридов калия и магния. Причина выбора данных электролитов заключалась в том, что хлорид калия является одним из наиболее индифферентных к полимеру электролитов, и изменение степени набухания геля



Рис. 2. Изменение степени набухания гранулы ПВС с магнетитом от номера фотографии в каждом десятке (точки). 1 – гранула сравнения. I-II-III-IV-V – гранулы которые взяты для исследования.

Fig. 2. Change in the degree of swelling of PVA granules with magnetite from the photograph number in each ten samples (points). 1 – comparison granule. I-II-III-IV-V – granules used for research.

Таблица 2. Статистические характеристики данных, приведенных на рис.2.

Table 2. Statistical characteristics of the data shown in Fig. 2.

	I	II	III	IV	V	Итого
Среднее	0.9964	0.9995	1.0011	1.0007	0.9994	0.9994
Медиана	0.9960	0.9992	1.0008	1.0007	0.9995	1.0001
СКО	0.0011	0.0017	0.0012	0.0006	0.0016	0.0021
Размах	0.0031	0.0043	0.0038	0.0019	0.0052	0.0083
Макс	0.9980	1.0019	1.0032	1.0016	1.0024	1.0032
Мин	0.9949	0.9976	0.9994	0.9997	0.9972	0.9949
Число фотографий N	10	10	10	10	10	50

Таблица 3. Составы приготовленных растворов

Table 3. The compositions of the prepared solutions.

Электролит	Концентрация (молярность)
KCl	3.10
MgCl ₂	1.5

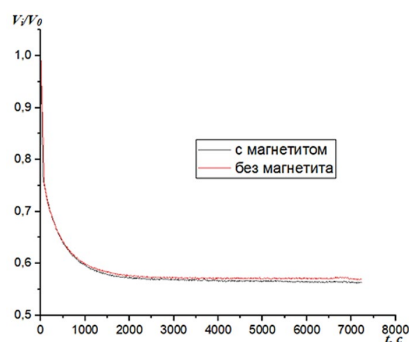


Рис. 3. Кинетика набухания гранулы геля ПВС и гранулы геля ПВС с магнетитом в растворе KCl (C= 3.1M).

Fig. 3. Swelling kinetics of a PVA gel granule and a PVA gel granule with magnetite in a KCl solution (C=3.1M).

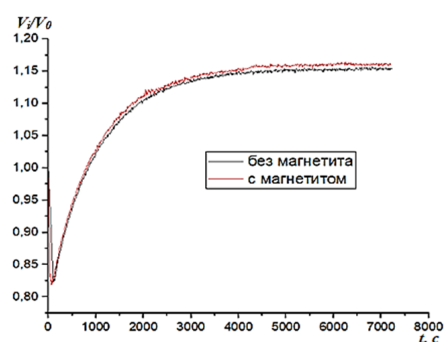


Рис. 4. Кинетика набухания гранулы геля ПВС и гранулы геля ПВС с магнетитом в растворе MgCl₂ (C= 1.5M).

Fig. 4. Swelling kinetics of PVA gel granule and PVA gel granule with magnetite in a MgCl₂ solution (C=1.5M).

при изменении концентрации раствора происходит исключительно в результате

изменения активности воды. Хлорид магния, напротив, образует координацион-

ные связи с полярными группами полимера, что приводит к заметному увеличению степени набухания геля.

Для проведения экспериментов готовили два изоактивных раствора, состав которых приведен в таблице 3.

Результаты проведенных экспериментов приведены на рис. 4 и 5. На них хорошо видно, что в обоих случаях формы кинетических кривых, полученных на гранулах «чистого» геля ПВС и на гранулах геля ПВС с магнетитом, в пределах чувствительности метода не различимы. Таким образом, присутствие магнетита в геле ПВС не проявляется ни на его равновесных, ни на кинетических свойствах. Полученный результат дает возможность использовать композит с магнетитом в аналитических целях при создании баз данных.

Заключение

Анализ результатов, полученных в работе, позволяет сделать по крайней мере

Список литературы

1. Ковалева С.С., Рубин Ф.Ф., Ферапонтов Н.Б. Особенности поведения сшитого поливинилового спирта в водных растворах низкомолекулярных электролитов. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2006. Т.6, № 2. С. 198-210.

2. Ферапонтов Н.Б., Ковалева С.С., Рубин Ф.Ф. Определение природы и концентрации растворенных веществ методом набухающей гранулы. // *Журн. аналит. химии*. 2007. Т.62, №10. С. 1-7.

3. Budtova T., Navard P. Swelling kinetics of a polyelectrolyte gel in water and salt solutions. Coexistence of swollen and collapsed phases // *Macromolecules*. 1998. Vol. 31. P. 8845-8850.

4. Zhao Y., Chen W., Yang Y., Yang X., Xu H. Swelling behavior of ionically cross-linked polyampholytic hydrogels in varied salt solutions // *Colloid Polym. Sci.* 2007. Vol. 285. P. 1395-1400.

два вывода. Во-первых, применение в методе оптической микрометрии в качестве сенсоров гелей с магнетитом практически решает проблему, связанную с поиском гранул сферической формы, необходимых для повышения точности метода. Фиксированное положение гранулы в ячейке позволяет проводить измерения и с гранулами в форме эллипсоидов вращения. Во-вторых, показано, что метод оптической микрометрии, укомплектованный указанным в работе оборудованием и материалом, позволяет проводить измерения концентраций анализируемых растворов с точностью 0.4%.

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.

5. Schott H. Swelling kinetics of polymers // *J. Macromol. Sci., part B: Physics*. 1992. Vol. 31, I. 1. P. 1-9.

6. Карпов С.И., Матвеева М.В., Селеменев В.Ф. Кинетика поглощения аминокислот гелевым катионитом КУ-2-8 // *Журн. физ. химии*. 2001. Т. 75, № 2. С. 266-271.

7. Tokmachev M.G., Ferapontov N.B., Gagarin A.N. Analysis of the swelling or shrinking kinetics of crosslinked hydrophilic polymers by mathematical modeling // *Journal of Mathematical Chemistry*. 2017. Vol. 55, Is. 1. P. 142-152.

8. Кавалерская Н.Е., Струсовская Н.Л., Ферапонтов Н.Б. Кинетика набухания и сорбционные свойства геля сшитого полиакриламида // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009. Т. 9, № 6. С. 796-804.

9. Changjie Wang, Yong Li and Zhibing Hu. Swelling kinetics of polymer gel // *Macromolecules*. 1997. Vol. 30, no16. P. 4727-4732.



10. Li S. Vatanparast R., Lemmetyinen H. Cross-linking kinetics and swelling behaviour of aliphatic polyurethane // *Polymer*. 2000. Vol. 41, no 15. P. 5571-5576.
11. Ivanov A.V., Smirnova M.A., Tikhanova O.A., Tokmachev M.G., Gagarin A.N., Ferapontov N.B. Granulated metamaterial «cross-linked polyvinyl alcohol-magnetite» for use in optical micrometry // *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2021. Vol. 55, no 5. P.1009-1014.
12. Ямсков И.А., Буданов М.В., Даванков В.А. Гидрофильные носители на основе поливинилового спирта для иммобилизации ферментов // *Биоорганическая химия*. 1979. Т. 5, № 11. С. 1728-1734.
13. Гервальд А.Ю., Прокопов Н.И., Ширякина Ю.М. Синтез суперпарамагнитных наночастиц магнетита // *Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова*. 2010. Т. 5, № 3. С. 45-49.
14. Костюшин В.Г., Нуриев А.В., Кожитов Л.В., Морчепко А.Т., Читанов Д.Н., Похолок К.В. Использование фазового магнитного анализа для исследования п контроля состава и свойств композитов Ре/С // *Российские нанотехнологии*. 2012. Т. 7, № 7. С. 32-35.
15. Костюшин В.Г., Нуриев, А.В. Остафийчук Б.К., Мокляк В.В. Мессбауэровские исследования магнитных полимерных нанокомпозицтов на основе магнетита и поливинилового спирта // *Известия высших учебных заведений. Материалы электронной техники*. 2013. Т. 4. С. 24-31.
16. Сенкевич С.И., Дружинина Т.В., Харченко И.М., Кряжев Ю.Г. Термопревращения поливинилового спирта - сырья для получения углеродных материалов // *Химия твердого топлива*. 2007. № 1. С. 51-58.
1. Kovaleva S.S., Rubin F.F., Ferapontov N.B. Osobennosti povedeniya sshitogo polivinilovogo spirta v vodnykh rastvorakh nizkomolekulyarnykh elektrolitov. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2006; 6(2): 198-210. (In Russ.)
2. Ferapontov N.B., Kovaleva S.S., Rubin F.F. Opredelenie prirody i koncentracii rastvorenykh veshchestv metodom nabukhayushchej granuly. *ZHurn. analit. khimii*. 2007; 62(10); 1-7. (In Russ.)
3. Budtova T., Navard P. Swelling kinetics of a polyelectrolyte gel in water and salt solutions. Coexistence of swollen and collapsed phases. *Macromolecules*. 1998; 31: 8845-8850.
4. Zhao Y., Chen W., Yang Y., Yang X., Xu H. Swelling behavior of ionically cross-linked polyampholytic hydrogels in varied salt solutions. *Colloid Polym. Sci*. 2007; 285: 1395-1400.
5. Schott H. Swelling kinetics of polymers. *J. Macromol. Sci., part B: Physics*. 1992; 31(1); 1-9.
6. Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F. Kinetika pogloshcheniya amino-kislot gelevym kationitom KU-2-8. *ZHurn. fiz. khimii*. 2001; 75(2): 266-271. (In Russ.)
7. Tokmachev M.G., Ferapontov N.B., Gagarin A.N. Analysis of the swelling or shrinking kinetics of crosslinked hydrophilic polymers by mathematical modeling. *Journal of Mathematical Chemistry*. 2017; 55(1): 142-152.
8. Kavalerskaya N.E., Strusovskaya N.L., Ferapontov N.B. Kinetika nabukhaniya i sorbcionnye svojstva gelya sshitogo poliakrilamida. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2009; 9(6): 796-804. (In Russ.)
9. Changjie Wang, Yong Li and Zhibing Hu. Swelling kinetics of polymer gel. *Macromolecules*. 1997; 30(16): 4727-4732.
10. Li S. Vatanparast R., Lemmetyinen H. Cross-linking kinetics and swelling behaviour of aliphatic polyurethane. *Polymer*. 2000; 41(15); 5571-5576.
11. Ivanov A.V., Smirnova M.A., Tikhanova O.A., Tokmachev M.G., Gagarin A.N., Ferapontov N.B. Granulated metamaterial «cross-linked polyvinyl alcohol-magnetite» for use in optical micrometry.



Theoretical Foundations of Chemical Engineering. 2021; 55(5): 1009-1014.

12. YAmnikov I.A., Budanov M.V., Davankov V.A. Gidrofil'nye nositeli na osnove polivinilovogo spirta dlya immobilizatsii fermentov. *Bioorganicheskaya khimiya. 1979; 5(11): 1728-1734. (In Russ.)*

13. Gerval'd A.YU., Prokopov N.I., SHiryakina YU.M. Sintez superparamagnitnykh nanochastich magnetite. *Vestnik MITKHT im. M.V. Lomonosova. 2010; 5(3): 45-49. (In Russ.)*

14. Kostyushin V.G., Nuriev A.B., Kozhitov L.V., Morchepko A.T., CHitanov D.N., Pokholok K.V. Ispol'zovanie

fazovogo magnitnogo analiza dlya issledovaniya p kontrolya sostava i svojstv kompozitov Re/S. *Rossijskie nanotekhnologii. 2012; 7(7): 32-35.*

15. Kostyushin V.G., Nuriev, A.B. Ostafijchuk B.K., Moklyak V.V. Messbauerovskie issledovaniya magnitnykh polimernykh nanokompozitov na osnove magnetita i polivinilovogo spirta. *Izvestiya vsshikh uchebnykh zavedenij. Materialy elektronnoy tekhniki. 2013; 4: 24-31. (In Russ.)*

16. KHarchenko I.M., Kryazhev YU.G. Termoprevra-shcheniya polivinilovogo spirta - syr'ya dlya polucheniya uglerodnykh materialov. *KHimiya tverdogo topliva. 2007;1: 51-58. (In Russ.)*

Информация об авторах / Information about the authors

Х.Р. Каримов – базовый докторант Самаркандского Государственного Университета, Самарканд, Узбекистан

А.В. Староверова – студентка химического факультета МГУ, Москва, Россия

М.Г. Токмачев – доцент физического факультета МГУ, Москва, Россия, Россия

Н.Б. Феропонтов – ведущий научный сотрудник химического факультета МГУ, Москва, Россия

Т.Т. Тробов – профессор Самаркандского Государственного Университета, Самарканд, Узбекистан

Kh.R. Karimov – basic doctoral student of Samarkand State University, Samarkand, Uzbekistan. E-mail: khusniddin_rustamovich@mail.ru

A.V. Staroverova – Student of the Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, Russian Federation, E-mail: staroverovan01@yandex.ru

M.G. Tokmachev. – associate professor, department of physics, Moscow Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation, E-mail: miket@mail.ru

N.B. Ferapontov – senior researcher, department of chemistry, Moscow Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation, E-mail: n.ferapontov@phys.chem.msu.ru

Kh.T. Trobov – professor of Samarkand State University, Samarkand, Uzbekistan, E-mail: trobov.xamza@mail.ru

Статья поступила в редакцию 16.11.2022; одобрена после рецензирования 20.02. 2023; принята к публикации 01.03.2023.

The article was submitted 16.11.2022; approved after reviewing 20.02. 2023; accepted for publication 01.03.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 615.07:547.56:543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11146

Применение методов обращённо-фазовой хроматографии для определения ди-трет-бутилфенолов в биологических жидкостях

Анна Павловна Чернова¹,

Владимир Камбулатович Шорманов²✉, Елена Паатовна Цацуа²,

Оксана Игоревна Пугачёва², Ольга Валерьевна Тарасова²

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

²Курский государственный медицинский университет», Курск, Россия, R-WLADIMIR@yandex.ru✉

Аннотация. Объектами исследования явились биологически активные полиалкилфенолы с ди-трет-бутильными радикалами в положениях «2» и «4» (2,4-ди-трет-бутилфенол (2,4-ДТБФ), 2,6-ди-трет-бутилфенол (2,6-ДТБФ) и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (2,6-ДТБ-4-МФ)), обладающие токсическими свойствами для человека. В качестве методов анализа применялись ТСХ (тонкий слой силикагеля СТХ-1А, модифицированного углеводородами с длиной цепи C14-C15), жидкостная колоночная хроматография обычного давления (колонок сорбента «Силасорб С-18 150×10 мм) и ВЭЖХ (колонок 250×4.6 мм Discovery® C18 с предколонок 20×4.0 мм).

Исследовались особенности хроматографической активности выбранного класса полиалкилфенолов в тонком слое и колонках обращённых фаз при использовании полярных элюентов, включающих различные (5-100 об.%) доли органического составляющего, которым мог являться ацетон или ацетонитрил. Как критерии идентификации ди-трет-бутилфенолов рассмотренной группой методов были рассчитаны основные параметры хроматографической подвижности аналитов. Было показано, что наиболее приемлемые условия разделения соединений рассматриваемой группы обеспечиваются в результате применения подвижных фаз вода – ацетонитрил (40:60) и буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70) (ТСХ), вода – ацетонитрил (20:80) (колоночная хроматография обычного давления), ацетатный буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70) (ВЭЖХ). Хроматографическая подвижность анализируемых соединений в предлагаемых условиях зависит от числа и взаимного расположения алкильных радикалов в их молекулах и увеличивается в соответствии с ростом их гидрофильности в ряду 2,4-ДТБ-4-МФ < 2,6-ДТБФ < 2,4-ДТБФ.

На основе комплекса выполненных экспериментов разработаны методики определения веществ-объектов исследования в жидких биоматрицах (крови и плазме). Эти методики по основным валидационным критериям соответствуют требованиям, существующим в практике биологического и химико-токсикологического анализа. Предельные минимальные количества ди-трет-бутилфенолов, обнаруживаемые разработанными методиками в 1 г крови, составляют $(1.8-8.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ТСХ) и $(1.0-5.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ВЭЖХ), в 1 г плазмы – $(1.6-5.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ТСХ) и $(1.0-3.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ВЭЖХ).

Возможно использование разработанных по результатам исследований и прошедших валидационную оценку методик в практике химико-токсикологического анализа ди-трет-бутилпроизводных фенола для объективного доказательства фактов отравления этими биологически активными веществами.

Ключевые слова: биологически активные ди-трет-бутилфенолы, ТСХ, колоночная хроматография, ВЭЖХ, кровь и плазма.

Для цитирования: Чернова А.П., Шорманов В.К., Цацуа Е.П., Пугачёва О.И., Тарасова О.В. Применение методов обращённо-фазовой хроматографии для определения ди-трет-бутилфенолов в биологических жидкостях // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 2. С. 225-235 <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11146>



Original article

The use of reversed-phase chromatography methods for the determination of di-tert-butylphenols in biological fluids

Anna P. Chernova¹, Vladimir K. Shormanov^{2✉}, Elena P. Tsatsua²,
Oksana I. Pugacheva², Olga V. Tarasova²

¹National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

²Voronezh State University, Voronezh, Russia, R-WLADIMIR@yandex.ru✉

Abstract. The objects of the study were biologically active polyalkylphenols with di-tert-butyl radicals in positions "2" and "4" (2,4-di-tert-butylphenol (2,4-DTBP), 2,6-di-tert-butylphenol (2,6-DTBP) and 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (2,6-DTB-4-MP) toxic to humans. TLC (a thin layer of CTX-1A silica gel modified with hydrocarbons with a chain length of C14-C15), conventional pressure liquid column chromatography (Silasorb C-18 sorbent column 150×10 mm) and HPLC (250×4.6 mm Discovery® C18 column with precolumn 20×4.0 mm) were used as analysis methods.

The features of the chromatographic activity of a selected class of polyalkylphenols in a thin layer and columns of reversed phases were studied using polar eluents, including various (5-100 vol. %) of the organic component, which could be acetone or acetonitrile. The main parameters of the chromatographic mobility of analytes were calculated as criteria for identifying di-tert-butylphenols using the group of considered methods. It was shown that the most acceptable conditions for the separation of considered compounds are provided as a result of the use of mobile phases water-acetonitrile (40:60) and buffer solution (pH 5.5) – acetonitrile (30:70) (TLC), water - acetonitrile (20:80) (column chromatography of ordinary pressure), acetate buffer solution (pH 5.5) - acetonitrile (30:70) (HPLC). The chromatographic mobility of the analysed compounds under the proposed conditions depends on the number and mutual arrangement of alkyl radicals in their molecules and increases with the increase of their hydrophilicity in the series 2,4-DTB-4-MP < 2,6-DTBP < 2,4-DTBP.

Based on the complex of performed experiments, methods for determination of the investigated substances in liquid biomatrices (blood and plasma) have been developed. According to the main validation criteria, these methods correspond to the requirements existing in the practice of biological and chemical-toxicological analysis. Limiting minimum quantities of di-tert-butylphenols detected by the developed methods in 1 g of blood are (1.8-8.0) 10⁻⁶ g (for TLC) and (1.0-5.0) 10⁻⁶ g (for HPLC), in 1 g of plasma – (1.6-5.0) 10⁻⁶ g (for TLC) and (1.0-3.0) 10⁻⁶ g (for HPLC).

The methods developed based on the results of studies after the validation assessment can be used for chemical and toxicological analysis of di-tert-butyl derivatives of phenol for evidence of the facts of poisoning by these biologically active substances.

Keywords: biologically active di-tert-butylphenols, TLC, column chromatography, HPLC, blood and plasma.

For citation: Chernova A.P., Shormanov V.K., Tsatsua E.P., Pugacheva O.I., Tarasova O.V. The use of reversed-phase chromatography methods for the determination of di-tert-butylphenols in biological fluids. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 225-235 (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11146>

Введение

Ди-*трет*-бутилфенолы – вещества, наиболее известные как антиоксиданты [1-4]. Данные соединения используются при получении пластификаторов, стабилизаторов, реактивного топлива, смол на синтетической основе, пестицидов [5-7], проявляют свойства ингибиторов роста сорных растений и фунгицидную активность [1, 8]. Ди-*трет*-бутилфенолы могут быть охарактеризованы как достаточно токсичные для человека и животных соединения [2, 9]. В литературных

источниках приводятся сообщения с описанием случаев острых отравлений людей ди-*трет*-бутилфенолами и структурно близкими веществами, часть из которых имела фатальные исходы [10-11].

Наличие у 2,6-ди-*трет*-бутилфенолов токсических свойств, активное применение этих соединений, случаи отравления 2,6-ди-*трет*-бутилфенолами людей позволяют считать их важными объектами для токсикологической химии.

Некоторые направления химико-токсикологического анализа ди-*трет*-бутил-



фенолов относительно мало проработаны. Например, не так детально исследованы особенности применения хроматографии для целей очистки данной группы полиалкилфенолов от примесей биологической природы, обнаружения и количественной оценки их присутствия в извлечениях из биожидкостей.

Цель данной работы – изучение вопросов определения ди-*трет*-бутилфенолов методами обращенно-фазовой хроматографии в жидких биологических матрицах.

Экспериментальная часть

Исследованию подверглись 2,4-ди-*трет*-бутилфенол (2,4-ДТБФ) («Sigma-Aldrich chemistry», содержание 99.0%); 2,6-ди-*трет*-бутилгидроксибензол (2,6-ДТБФ) («Sigma-Aldrich chemistry»), содержание $\geq 99.0\%$; 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (2,6-ДТБ-4-МФ) («Acros organics», содержание $\geq 99.8\%$). Внутренний стандарт – фенол (Ф) (ч.д.а., «Вектон», содержание 99.5%).

В работе применена группа методов хроматографического анализа: ТСХ, жидкостная колоночная хроматография обычного давления (ЖКХОД) и ВЭЖХ. Во всех случаях применялся обращенно-фазовый вариант проведения процесса.

В методе ТСХ неподвижной фазой являлся силикагель (степень дисперсности – 5 мкм), модифицированный углеводородами с числом атомов углерода 14-15. На стартовую линию пластины исследуемые ди-*трет*-бутилфенолы наносили в форме 0.02%-ых растворов (наносимый объем – 5-10 мкм). Хроматографировали, применяя восходящий режим элюирования. Подвижные фазы – вода и буферные растворы, а также их бинарные композиции с органическими модификаторами.

Пятна анализов детектировали на полученных хроматограммах, воздействуя на них УФ-излучением с длиной волны 254 нм. Вычисляли основные параметры, характеризующие подвижность анализов

(R_f , R_s , B – условное удерживание) и возможность их разделения (N – число теоретических тарелок, k' – коэффициент емкости, H – высота, эквивалентная 1 теоретической тарелке, R – критерий разделения). Рассматривали влияние на скорость перемещения анализов в тонком слое от уровня содержания модификатора в бинарных элюентах.

В методе ЖКХОД сорбентом являлся Silasorb C_{18} 30 мкм, сформированный в виде колонки 150×10 мм. Аналиты вносили в колонку в форме 0.25%-ых растворов в элюентах (вносимый объем 2 см³). Объем каждой фракции собираемых элюатов – 2 см³. Наличие ди-*трет*-бутилфенолов в отдельных фракциях устанавливали методом спектрофотометрии после удаления растворителя и растворения остатка в этаноле. Для анализов вычисляли время удерживания (t_R) и ряд других, приводимых выше параметров.

Воспроизводя ВЭЖХ, использовали прибор «LC-20 Prominace» (Shimadzu) с матричным фотодиодным детектором, колонкой Discovery® C_{18} 250×4.6 мм (Supelco), термостатируемой при 40°C, и предколонкой Discovery® C_{18} 20×4.0 мм (Supelco). Элюировали со скоростью 1 см³/мин. Сигнал регистрировали при 280 нм. Параметры хроматографирования вычисляли по известным формулам. Для оценки количественного содержания ди-*трет*-бутилфенолов рассчитывали уравнения градуировочных графиков (линейной зависимости площади пика от содержания аналита в элюируемом объеме).

Обсуждение результатов

Результаты изучения подвижности ди-*трет*-бутилфенолов в тонком слое сорбента отражены в табл. 1.

Эти результаты показывают, что при применении монокомпонентных элюентов (вода и буферные растворы) хроматографическая подвижность анализов низка, что не обеспечивает необходимой селективности определения.

Таблица 1. Подвижность ди-*tert*-бутилфенолов в тонком слое сорбента СТХ-1А, модифицированного углеводородами с длиной цепи C₁₄-C₁₅

Table 1. Mobility of di-*tert*-butylphenols in a thin layer of STX-1A sorbent modified with hydrocarbons with a chain length of C₁₄-C₁₅

Элюент	Доля модификатора, об. %	Характеристики подвижности						Ф
		2,4-ДТБФ		2,6-ДТБФ		2,6-ДТБ-4-МФ		
		Абсолютная (Rf)	Относительная (Rs)	Абсолютная (Rf)	Относительная (Rs)	Абсолютная (Rf)	Относительная (Rs)	
Раствор (рН 5.5)	-	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.10
Вода	-	0.06	0.42	0.03	0.15	0.02	0.13	0.15
Раствор (рН 9.91)	-	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09
Вода – ацетон	80	0.56	0.64	0.45	0.88	0.31	0.35	0.88
Вода – ацетон Раствор (рН 5.5) – ацетон	70	0.40	0.49	0.33	0.82	0.25	0.31	0.82
	60	0.32	0.41	0.28	0.78	0.18	0.23	0.78
	50	0.23	0.36	0.18	0.64	0.12	0.19	0.64
	40	0.15	0.30	0.13	0.50	0.07	0.14	0.50
	30	0.10	0.22	0.08	0.45	0.05	0.11	0.45
	20	0.07	0.21	0.05	0.34	0.03	0.09	0.34
	80	0.59	0.69	0.47	0.86	0.35	0.41	0.86
Раствор (рН 5.5) – ацетон Раствор (рН 9.91) – ацетон	70	0.46	0.58	0.40	0.80	0.27	0.34	0.80
	60	0.36	0.52	0.32	0.69	0.22	0.32	0.69
	50	0.25	0.46	0.21	0.55	0.17	0.31	0.55
	40	0.17	0.33	0.13	0.52	0.10	0.19	0.52
	30	0.12	0.26	0.09	0.47	0.08	0.17	0.47
	20	0.09	0.25	0.06	0.36	0.05	0.14	0.36
	80	0.57	0.67	0.49	0.85	0.39	0.46	0.85
Раствор (рН 9.91) – ацетон Вода – ацетонитрил	70	0.52	0.65	0.44	0.80	0.32	0.40	0.80
	60	0.44	0.61	0.35	0.72	0.25	0.35	0.72
	50	0.32	0.54	0.25	0.59	0.14	0.24	0.59
	40	0.23	0.44	0.17	0.52	0.09	0.17	0.52
	30	0.16	0.36	0.10	0.44	0.07	0.16	0.44
	20	0.11	0.33	0.07	0.33	0.04	0.12	0.33
	80	0.78	0.84	0.58	0.93	0.45	0.48	0.93
Вода – ацетонитрил Раствор (рН 5.5) – ацетонитрил	70	0.69	0.80	0.48	0.86	0.36	0.42	0.86
	60	0.61	0.77	0.38	0.79	0.24	0.31	0.79
	50	0.44	0.65	0.31	0.68	0.20	0.29	0.68
	40	0.33	0.60	0.24	0.55	0.15	0.27	0.55
	30	0.21	0.45	0.15	0.47	0.11	0.23	0.47
	20	0.16	0.41	0.10	0.39	0.05	0.13	0.39
	80	0.70	0.75	0.56	0.94	0.42	0.45	0.94
Раствор (рН 5.5) – ацетонитрил Раствор (рН 9.91) – ацетонитрил	70	0.58	0.65	0.42	0.89	0.27	0.30	0.89
	60	0.43	0.51	0.32	0.85	0.19	0.22	0.85
	50	0.36	0.46	0.23	0.79	0.15	0.19	0.79
	40	0.23	0.37	0.17	0.62	0.11	0.18	0.62
	30	0.16	0.33	0.11	0.49	0.08	0.16	0.49
	20	0.12	0.29	0.08	0.41	0.05	0.12	0.41
	80	0.67	0.73	0.45	0.49	0.38	0.41	0.92
Раствор (рН 9.91) – ацетонитрил	70	0.61	0.68	0.39	0.43	0.31	0.34	0.90
	60	0.54	0.66	0.33	0.40	0.24	0.29	0.82
	50	0.46	0.63	0.28	0.38	0.20	0.27	0.73
	40	0.35	0.60	0.21	0.36	0.15	0.26	0.58
	30	0.21	0.47	0.13	0.29	0.11	0.24	0.45
	20	0.13	0.31	0.06	0.15	0.05	0.13	0.39

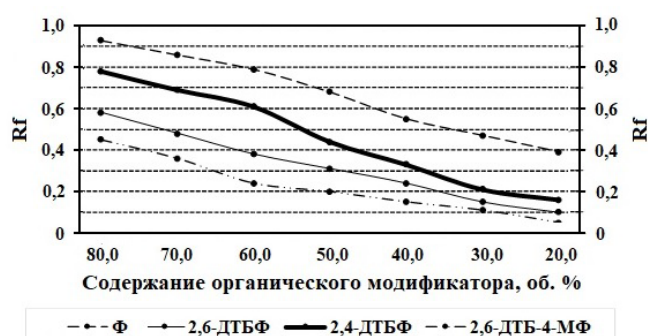


Рис. 1. Диаграммы хроматографирования ди-*трет*-бутилфенолов с использованием подвижных фаз вода – ацетонитрил

Fig. 1. Diagrams of chromatography of di-*tert*-butylphenols using mobile phases water – acetonitrile

Таблица 2. Параметры хроматографирования ди-*трет*-бутилфенолов в тонком слое сорбента с применением оптимальных подвижных фаз

Table 2. Chromatography parameters for di-*tert*-butylphenols in a thin layer of sorbent using optimal mobile phases

Аналит	Найденные параметры				
	В	k'	N	H, мм	R _s
Вода – ацетонитрил (40:60)					
Фенол	1.27	0.27	1136	0.070	1.83 3.81 3.20
2,4-ДТБФ	1.59	0.59	1343	0.060	
2,6-ДТБФ	2.63	1.63	924	0.087	
2,6-ДТБ-4-МФ	4.17	3.17	655	0.122	
Буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70)					
Фенол	1.12	0.12	1267	0.063	3.76 2.91 3.64
2,4-ДТБФ	1.72	1.72	1264	0.064	
2,6-ДТБФ	2.38	1.38	1393	0.057	
2,6-ДТБ-4-МФ	3.70	2.70	829	0.097	

Переходя к бинарным подвижным фазам, удаётся увеличить хроматографическую подвижность ди-*трет*-бутилфенолов, оптимизируя тем самым процесс определения и обеспечивая лучшее разделение аналитов.

Как видно из табл. 1, для каждой группы бинарных элюентов отмечается рост хроматографической подвижности анализируемых ди-*трет*-бутилфенолов с увеличением содержания органического модификатора в элюенте.

Наилучшие условия разделения аналитов методом ТСХ обусловлены применением групп подвижных фаз вода – ацетонитрил и раствор (pH 5.5) – ацетонитрил. Диаграммы, отражающие зависимость хроматографической подвижности аналитов от концентрации органического

модификатора в группе элюентов вода – ацетонитрил изображена на рис. 1. Как видно из рисунка, оптимальным элюентом в данной группе является смесь вода-ацетонитрил (40:60). Из группы подвижных фаз раствор (pH 5.5) – ацетонитрил оптимальной является смесь с соотношением разбавителя и модификатора (30:70). Хроматографические характеристики исследуемых ди-*трет*-бутилфенолов в случае применения этих подвижных фаз отражены в табл. 2.

Спектрофотометрическое доказательство присутствия ди-*трет*-бутилфенолов в отдельных фракциях элюата при использовании метода ЖКХОД проводилось по форме спектра в этаноле и положению максимумов поглощения: 211 и 271 нм (для Ф), 225 нм и 280 нм (для 2,4-

Таблица 3. Параметры, описывающие поведение ди-*tert*-бутилфенолов в колонке неподвижной фазы Silasorb C₁₈ 30 мкм при элюировании смесями вода-ацетонитрил
 Table 3. Parameters describing the behaviour of di-*tert*-butylphenols in stationary phase column Silasorb C₁₈ phases 30 μm during elution with water-acetonitrile mixtures

Аналит	Отношение компонентов в элюенте вода-ацетонитрил	V _R , см ³	t _R , мин	k'	N	H, мм
Фенол	40:60	15.8	19.75	1.43	269	0.558
	30:70	15.6	16.60	1.40	159	0.943
	20:80	13.6	12.83	1.09	89	1.685
	10:90	13.2	8.63	1.03	52	2.885
	5:95	13.0	7.78	1.00	41	3.659
	0:100	12.8	7.19	0.97	32	4.688
2,4-ди- <i>tert</i> -бутилфенол	30:70	39.1	41.60	5.02	682	0.220
	20:80	23.6	22.26	2.63	175	0.857
	10:90	17.5	11.44	1.69	47	3.192
	5:95	15.4	9.22	1.37	32	4.688
	0:100	13.4	7.52	1.06	24	6.250
2,6-ди- <i>tert</i> -бутилфенол	30:70	50.3	53.51	6.74	1049	0.143
	20:80	28.4	26.79	3.37	285	0.526
	10:90	19.2	12.55	1.95	60	2.500
	5:95	16.0	9.58	1.46	41	3.658
	0:100	13.7	7.71	1.11	25	6.000
2,6-ди- <i>tert</i> -бутил-4-метилфенол	20:80	37.5	35.38	4.77	869	0.173
	15:85	25.5	19.32	2.92	332	0.452
	10:90	21.5	14.05	2.31	153	0.980
	5:95	19.5	11.68	2.00	112	1.339
	0:100	14.0	7.88	1.15	47	3.192

ДТБФ), 224 и 275 нм (для 2,6-ДТБФ, 212 и 279 нм (для 2,6-ДТБ-4-МФ).

Параметры хроматографирования аналитов методом ЖКХОД в случае использования в качестве элюентов воды, ацетонитрила и композиций данных растворителей в тех или иных соотношениях (по объёму) отражены в табл. 3.

Как показывают данные табл. 3, универсальный элюент, обеспечивающий хорошие условия хроматографирования всех аналитов, – система вода – ацетонитрил (20:80). Она позволяет селективно определять ди-*tert*-бутилфенолы при их совместном присутствии и в присутствии гидрофильных эндогенных соединений биоматериала, выходящих из колонки в первых фракциях элюата (4-8 см³).

Хроматограмма смеси ди-*tert*-бутилфенолов (метод ЖКХОД), получен-

ная на основе определения значений оптической плотности этанольных растворов остатков фракций элюата в области длинноволновых максимумов аналитов после элюирования системой вода – ацетонитрил (20:80) представлена на рис. 2.

Рис. 2 демонстрирует возможность разделения аналитов в предлагаемой колонке при их совместном присутствии.

В отличие от стандартных патронов (картриджей), рассчитанных на очистку извлечений из небольших навесок биоматриц, колонка (150×10 мм) сорбента «Силасорб» C₁₈ позволяет очищать извлечения из значительных количеств биожидкостей и тканей. Это важно в практике судебно-химического анализа, где по нормативам на исследование берут 25-100 г биоматериала. С другой стороны, предлагаемая колонка позволяет не только очищать аналиты, но и разделять

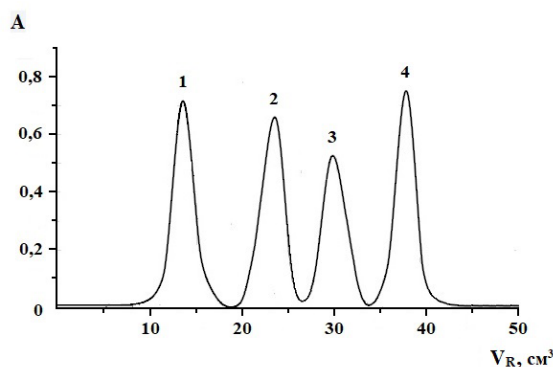


Рис. 2. Хроматограмма (ЖКХОД) смеси анализируемых соединений
 1 – Ф, 2 – 2,4-ДТБФ, 3 – 2,6-ДТБФ, 4 – 2,6-ДТБ-4-МФ (колонка Силасорб C₁₈ 150×10 мм,
 элюент – вода – ацетонитрил (20:80))

Fig. 2. Chromatogram (LCC) of a mixture of analysed compounds
 1 – F, 2 – 2,4-DTBP, 3 – 2,6-DTBP, 4 – 2,6-DTB-4-MP (column Silasorb C₁₈ 150×10 mm,
 eluent – water – acetonitrile (20:80))

Таблица 4. Основные параметры хроматографирования ди-*tert*-бутилфенолов методом ВЭЖХ (колонка Discovery® C₁₈ 250×4.6 мм; подвижная фаза ацетатный буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70))

Table 4. Basic chromatography parameters of di-*tert*-butylphenols by HPLC (column Discovery® C₁₈ 250×4.6 mm; mobile phase acetate buffer solution (pH 5.5) – acetonitrile (30:70))

Хроматографируемые вещества	t _R , мин	V _R , мл	k'	ω, мин	N	H, мм	R _s
Фенол	4.700	4700	0.516	0.28	4398	0.057	13.750
2,4-ДТБФ	9.187	9187	1.964	0.38	9352	0.027	7.229
2,6-ДТБФ	11.989	11989	2.867	0.45	11356	0.022	5.501
2,6-ДТБ-4-МФ	14.602	14602	3.710	0.50	13646	0.018	

их смеси с возможным дальнейшим определением каждого из них.

При определении ди-*tert*-бутилфенолов методом ВЭЖХ в качестве элюента использовали смесь раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70).

Основные хроматографические параметры рассматриваемых аналитов с использованием метода ВЭЖХ отражены в табл. 4.

Как видно из полученных данных, предлагаемая хроматографическая система позволяет достичь относительно высокой эффективности колонки в отношении рассматриваемых ди-*tert*-бутилфенолов и обеспечить их полное разделение при одновременном содержании в элюируемом объеме.

Предел обнаружения аналитов методом ВЭЖХ – 5.0·10⁻⁹-1.0·10⁻⁸ г в элюируемой пробе. Величина относительной

ошибки среднего результата при количественном определении ди-*tert*-бутилфенолов – не более 1.15% (n=6; P=0.95). Как показывают результаты определения различными методами, хроматографическая подвижность анализируемых соединений в предлагаемых условиях зависит от числа и взаимного расположения алкильных радикалов в их молекулах и увеличивается в соответствии с ростом гидрофильности в ряду 2,4-ДТБ-4-МФ < 2,6-ДТБФ < 2,4-ДТБФ.

На основе предварительных исследований предложены пути очистки и определения аналитов в биожидкостях выбранной группой методов.

Методики определения аналитов в биожидкостях. Модельные смеси (по 25 г) на основе крови или плазмы, содержащие 0.0002-0.04% аналитов, которые сохраняли ¼ часа при 18-22°C, после чего

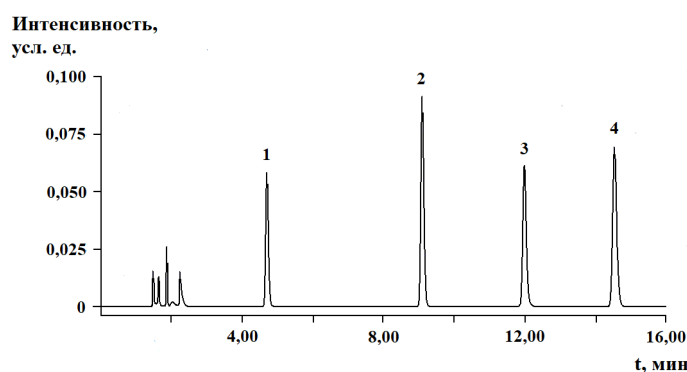


Рис. 3. Хроматограмма (ВЭЖХ) анализируемых соединений, выделенных из крови:
 1 – Ф, 2 – 2,4-ДТБФ, 3 – 2,6-ДТБФ, 4 – 2,6-ДТБ-4-МФ (колонка Discovery® C₁₈
 250×4.6 мм, элюент – буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70))

Fig. 3. Chromatogram (HPLC) of analysed compounds isolated from blood:
 1 – P, 2 – 2,4-DTBP, 3 – 2,6-DTBP, 4 – 2,6-DTB-4-MP (column Discovery® C₁₈
 250×4.6 mm, eluent – buffer solution (pH 5.5) – acetonitrile (30:70))

дважды по 30 мин обрабатывали порциями (50 см³ каждая) бинарного экстрагента ацетон-этилацетат (1:1) (по объёму).

Экстракты пропускали сквозь слой (высота 1.5 см, диаметр ≈ 4 см) Na₂SO₄, после чего сквозь него же пропускали 20 см³ бинарного экстрагента ацетон-этилацетат (1:1). Объединив фильтраты и поместив в поток воздуха, их упаривали до 0.7-1.0 см³, после чего, поместив в поток азота, добивались полного удаления растворителей,

Остаток обрабатывали 2 см³ системы вода – ацетонитрил (20:80), вводили раствор в колонку (150×10 мм) сорбента «Силасорб C₁₈», элюировали смесью растворителей вода – ацетонитрил (20:80). Элюат собирали по 2 см³ в отдельные пробирки. Порции аналита, содержащие тот или иной ди-*трет*-бутилфенол, сливали в фарфоровую чашку, обрабатывали 0.4 см³ 1%-ого раствора NaOH, помещали в поток воздуха комнатной температуры и удаляли растворители. Остаток растворяли в 1.8 см³ бинарной системы диэтиловый эфир – HCl конц. (92:8), вводили туда 0.5 г Na₂SO₄ и, используя поток азота, удаляли жидкую часть раствора. Растворив остаток в 5 см³ ацетонитрила, получали раствор для анализа.

ТСХ. 0.4 см³ раствора для анализа помещали на поверхность сорбента (модель привитой фазы C₁₄-C₁₅). Определение проводили, элюируя смесью вода-ацетонитрил (40:60). Аналиты идентифицировали по величине R_f после обнаружения их пятен в УФ-свете.

ВЭЖХ. 2.5 см³ раствора для анализа смешивали с 5.5 см³ ацетонитрила в мерной колбе на 10 см³ и доводили до метки ацетатным буфером (pH 5.5). 2 мкл образующегося раствора подвергали хроматографированию, элюируя системой ацетатный буферный раствор (pH 5.5) – ацетонитрил (30:70) со скоростью 1 см³/мин, регистрируя оптическую плотность при 280 нм. Хроматограмма смеси ди-*трет*-бутилфенолов, выделенных из крови, изображена на рис. 3. С этой хроматограммой практически совпадает хроматограмма смеси аналитов, выделенных из плазмы с той лишь разницей, что интенсивность сигнала в области 2.0±0.5 мин, обусловленного остатками эндогенных веществ биоматрицы, заметно ниже.

Идентификация аналитов проводилась по времени (объёму) удерживания. Предел обнаружения в 1 г биоматриц составляет 3.0·10⁻⁶ г (кровь) и 2.0·10⁻⁶ г (плазма) для 2,4-ДТБФ, 5.0·10⁻⁶ г (кровь) и 3.0·10⁻⁶ г (плазма) для 2,6-ДТБФ, 1.0·10⁻⁶ г

Таблица 5. Валидация методик по показателям правильности и прецизионности
 Table 5. Validation of methods by accuracy and precision

Биоматрица	Аналит	Добавлено аналита в биоматрицу, г/г	Определено							
			в первый день				в последующий день			
			\bar{x} (n=5), г/г	S	S _r , %	ε, %	\bar{x} (n=5), г/г	S	S _r , %	ε, %
Кровь	2,4-ДТБФ	2.4·10 ⁻⁵	2.549·10 ⁻⁵	8.010·10 ⁻⁷	3.15	6.21	2.536·10 ⁻⁵	7.704·10 ⁻⁷	3.02	5.66
		2.0·10 ⁻⁴	2.167·10 ⁻⁴	4.749·10 ⁻⁶	2.19	8.34	2.192·10 ⁻⁴	4.362·10 ⁻⁶	2.27	-4.05
		3.6·10 ⁻⁴	3.724·10 ⁻⁴	7.141·10 ⁻⁶	1.92	3.44	3.350·10 ⁻⁴	6.808·10 ⁻⁶	2.03	-6.95
	2,6-ДТБФ	3.6·10 ⁻⁵	3.405·10 ⁻⁵	9.602·10 ⁻⁷	2.83	-5.43	4.052·10 ⁻⁵	1.211·10 ⁻⁶	2.98	12.56
		2.4·10 ⁻⁴	2.562·10 ⁻⁴	6.230·10 ⁻⁶	2.43	6.75	2.596·10 ⁻⁴	6.619·10 ⁻⁶	2.55	8.18
		4.8·10 ⁻⁴	4.454·10 ⁻⁴	9.862·10 ⁻⁶	2.21	-7.21	4.845·10 ⁻⁴	1.032·10 ⁻⁵	2.13	0.95
	2,6-ДТБ-4-МФ	6.0·10 ⁻⁶	6.769·10 ⁻⁶	2.406·10 ⁻⁷	3.55	12.81	6.522·10 ⁻⁶	2.217·10 ⁻⁷	3.40	8.70
		1.6·10 ⁻³	1.727·10 ⁻³	4.193·10 ⁻⁵	2.43	7.95	1.763·10 ⁻³	4.152·10 ⁻⁵	2.36	10.16
		3.2·10 ⁻³	3.420·10 ⁻³	7.240·10 ⁻⁵	2.12	6.87	2.879·10 ⁻³	6.280·10 ⁻⁵	2.18	-10.02
Плазма	2,4-ДТБФ	1.2·10 ⁻⁵	1.296·10 ⁻⁵	4.001·10 ⁻⁷	2.84	8.02	1.141·10 ⁻⁵	3.303·10 ⁻⁷	2.91	-4.95
		1.6·10 ⁻⁴	1.674·10 ⁻⁴	3.068·10 ⁻⁶	1.83	4.63	1.715·10 ⁻⁴	3.376·10 ⁻⁶	1.97	7.20
		3.0·10 ⁻⁴	3.189·10 ⁻⁴	5.590·10 ⁻⁶	1.75	6.31	2.953·10 ⁻⁴	4.890·10 ⁻⁶	1.66	-1.57
	2,6-ДТБФ	3.6·10 ⁻⁵	3.765·10 ⁻⁵	9.603·10 ⁻⁷	2.56	4.57	3.896·10 ⁻⁵	1.051·10 ⁻⁶	2.71	8.22
		2.4·10 ⁻⁴	2.568·10 ⁻⁴	5.857·10 ⁻⁶	2.28	6.98	2.511·10 ⁻⁴	5.553·10 ⁻⁶	2.21	4.63
		4.8·10 ⁻⁴	4.908·10 ⁻⁴	9.532·10 ⁻⁶	1.94	2.25	4.499·10 ⁻⁴	1.076·10 ⁻⁵	2.39	-6.26
	2,6-ДТБ-4-МФ	6.0·10 ⁻⁶	6.578·10 ⁻⁶	2.170·10 ⁻⁷	3.30	9.64	6.639·10 ⁻⁶	2.129·10 ⁻⁷	3.21	10.65
		1.6·10 ⁻³	1.708·10 ⁻³	3.683·10 ⁻⁵	2.16	6.73	1.728·10 ⁻³	4.082·10 ⁻⁵	2.36	8.02
		3.2·10 ⁻³	3.513·10 ⁻³	6.974·10 ⁻⁵	1.99	9.78	2.992·10 ⁻³	6.395·10 ⁻⁵	2.14	-6.49

(кровь) и 1.0·10⁻⁶ г (плазма) для 2,6-ДТБ-4-МФ.

Количество аналитов, присутствующих в биожидкостях, рассчитывали, исходя из площади пика, по уравнениям соответствующих градуировочных графиков.

Разработанные методики валидировали по критериям линейности, селективности, стабильности.

Результаты валидации по критериям правильности и прецизионности отражены в табл. 5.

Заключение

Изучено хроматографическое поведение ряда ди-*трет*-бутилфенолов в тонком слое и колонках обращённо-фазовых сорбентов.

Выявлена связь хроматографической активности выбранной группы ди-*трет*-бутилпроизводных фенола с особенностями химической структуры аналитов, компонентным составом подвижных фаз и долей органического составляющего в них.

Рассмотренные методы хроматографии применимы для очистки аналитов, их идентификации и оценки количественного содержания. Выполненные эксперименты явились основой для разработки методик определения исследуемых веществ в биожидкостях. Методики соответствуют валидационным требованиям,

принятым в области биологического анализа. Пределы обнаружения ди-*трет*-бутилфенолов разработанными методиками в 1 г крови составляют $(1.8-8.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ТСХ) и $(1.0-5.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ВЭЖХ), в 1 г плазмы – $(1.6-5.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ТСХ) и $(1.0-3.0) \cdot 10^{-6}$ г (для ВЭЖХ).

Разработанные методики могут применяться в химико-токсикологическом анализе ди-*трет*-бутилфенолов для доказательства фактов отравления данными соединениями.

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. Chuah T.S., Norhafizah M.Z., Ismail B.S. Evaluation of the biochemical and physiological activity of the natural compound, 2,4-ditert-butylphenol on weeds. *Crop and Pasture Science*. 2015; 66(2): 214-223. <https://doi.org/10.1071/CP13386>

2. Butylated hydroxytoluene. PubChem. Open chemistry database. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butylated-hydroxytoluene> (accessed 30 January 2022).

3. Yehye W.A, Rahman N.A., Ariffin A., Abd Hamid S.B., Alhadi A.A., Kadir F.A., Yaeghoobi M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 101: 295-312. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026>

4. Zhou Z., Wu J., Liu K., Tao W., Liu Y., Yang M. Electrochemical Behavior of the Antioxidant 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol in an Electrolyte Containing Transformer Oils. *CSJ Journals*. 2017; 46(3): 323-326. <https://doi.org/10.1246/cl.161003>

5. Farajzadeh M.A., Goushjuui L., Ranji A., Feyz E. Spectrophotometric determination of Irgafos 168 in polymers after different sample preparation procedures. *Microchim Acta*. 2007; 159(3): 263-268. <https://doi.org/10.1007/s00604-006-0721-8>

6. Camacho W., Karlsson S. Quantification of antioxidants in polyethylene by near infrared (NIR) analysis and partial least squares (PLS) regression. *Inter. J. Polym. Anal. Character*. 2002; 7(1-2): 41-51. <https://doi.org/10.1080/10236660214597>

7. Krushevskaya A.P., Klimash J., Smith J.F., Williams E.A., McCloskey P.J., Ravikumara V. Determination of phosphorus in polymeric systems using an ashing procedure and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. At Spectrom*. 2004; 19(9): 1186-1191. <https://doi.org/10.1039/B402000F>

8. Belghit S., Driche E.H., Bijani C., Zitouni A., Sabaou N., Badji B., Mathieu F. Activity of 2,4-Di-tert-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *J. Mycol. Med*. 2016; 26(2): 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.03.001>



9. Hirata-Koizumi M., Hamamura M., Furukawa H., Fukuda N., Ito Y., Wako Y., Yamashita K., Takahashi M., Kamata E., Ema M., Hasegawa R. Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-tert-butylphenol and 2,4-di-tert-butylphenol toxicity. *Congenit Anom.* 2005; 45(4): 146-153. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2005.00084.x>

10. Shormanov V.K., Astashkina A.P., Ostanin M.A., Grishechko O.I., Tsatsua E.P. The specific features of the distribution of 4-metoxyhydroxybenzene in the organism of

the warm-blooded animals suffering lethal intoxication. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa.* 2016; 59(4): 48-53. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659448-53> (In Russ.).

11. Shormanov V.K., Pugacheva O.I., Astashkina A.P., Tsatsua E.P. The specific features of the distribution of 2,6-di-tert-butyl-4-methylhydroxybenzole in the organism of the warm-blooded animals. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa.* 2016; 59(1): 29-34. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659129-34> (In Russ.).

Информация об авторах / Information about the authors

А.П. Чернова – к.х.н., доцент отделения химической инженерии Инженерной школы природных ресурсов Национального исследовательского Томского политехнического университета, Томск, Россия

В.К. Шорманов – д.ф.н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, Россия

Е.П. Цацуа – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, Россия

О.И. Пугачёва – заочный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, Россия

О.В. Тарасова – к.ф.н., доцент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, Россия

A.P. Chernova – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor of the Department of Chemical Engineering of the Faculty of Engineering of Natural Resources National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation, E-mail: apa2004@mail.ru

V.K. Shormanov – Doctor of Pharmacy, professor of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, E-mail: RWLADIMIR@yandex.ru

E.P. Tsatsua – postgraduate student of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, e-mail: tsatsua-elena@yandex.ru

O.I. Pugacheva – correspondence post-graduate student of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, E-mail: inpugacheva@yandex.ru

O.V. Tarasova – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, E-mail: tarasova_olga_kursk@mail.ru

Статья поступила в редакцию 27.12.2022; одобрена после рецензирования 21.03.2023; принята к публикации 22.03.2023.

The article was submitted 27.12.2022; approved after reviewing 21.03.2023; accepted for publication 22.03.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11147

Новая неподвижная фаза на основе ионной жидкости для двумерной газовой хроматографии с высокой селективностью к ароматическим анализам

Михаил Вадимович Шашков¹✉, Павел Алексеевич Долгушев¹

¹Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова» СО РАН, Новосибирск, Россия, shashkov@catalysis.ru[✉]

Аннотация. Ионные жидкости являются уникальным классом веществ объединяющие свойства органической и неорганической материи. Они проявляют свойства органических полярных растворителей, и благодаря ионной структуре молекулы обладают такими свойствами как высокая вязкость и низкое давление насыщенных паров, что обычно свойственно неорганическим соединениям. Недавно было показано, что ряд ионных жидкостей обладает характеристиками, позволяющими использовать их в качестве неподвижных жидких фаз для капиллярной газовой хроматографии. В частности, одним из направлений в разработке новых колонок стало создание неподвижной жидкой фазы на основе ионной жидкости, которая демонстрирует повышенное разрешение при разделении ароматических и кислородсодержащих соединений. Проводя исследования в данном направлении, была создана данная работа, которая посвящена созданию и исследованию новой высокополярной капиллярной колонки с неподвижной жидкой фазой на основе бензил-акридиниевой ионной жидкости. Показано, что данная колонка обладает высокими показателями водородной связи и π - π взаимодействий с точки зрения модели Абрахама. При этом, акридиниевая ионная жидкость являясь, как и аналогичные фазы на основе ионных жидкостей, высокополярной, проявляет повышенную селективность в удержании ароматических соединений (ароматические углеводороды, фенолы и подобные соединения) и большинству кислородсодержащих соединений и оснований в сравнении с алифатическими углеводородами. Это позволяет проводить разделения сложных смесей, включающих ароматические углеводороды и кислородсодержащие соединения. Также показана высокая термическая стабильность разработанной колонки, сравнимая с аналогами на основе хинолиниевых ионных жидкостей, но в отличие от них имеющая другую селективность, обусловленную более высокими значениями π - π взаимодействий и водородной связи по донорному механизму. Это открывает новые перспективы для использования этой колонки и, вероятно, её аналогов, для разделения сложных смесей, содержащих полярные ароматические и кислородсодержащие соединения, особенно в двумерной хроматографии. Данные особенности были показаны на примере разделения сложной смеси методом двумерной газовой хроматографии, где данная колонка выступала в качестве второй колонки.

Ключевые слова: ионные жидкости, капиллярная хроматография, двумерная хроматография

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания института катализа СО РАН

Для цитирования: Шашков М.В., Долгушев П.А. Новая неподвижная фаза на основе ионной жидкости для двумерной газовой хроматографии с высокой селективностью к ароматическим анализам // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 2. С. 236-243.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11147>

Original article

New ionic liquid based stationary phase for 2D gas chromatography with high selectivity to aromatic analytes

Mikhail V. Shashkov¹✉, Pavel A. Dolgushev¹

¹Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russian Federation, shashkov@catalysis.ru[✉]



Abstract. Ionic liquids are a unique class of substances that combine the properties of organic and inorganic matter. They exhibit the properties of organic polar solvents, and due to the ionic structure of the molecules, they have such properties as high viscosity and low vapour pressure, which are usually characteristic of inorganic compounds. Recently, a number of ionic liquids have been shown to have characteristics that allow them to be used as stationary liquid phases for capillary gas chromatography. In particular, one of the directions in the development of new columns was the creation of a stationary liquid phase based on an ionic liquid, which demonstrates increased resolution in the separation of aromatic and oxygen-containing compounds. This study was performed by conducting research devoted to the creation and study of a new high-polarity capillary column with a stationary liquid phase based on benzyl-acridinium ionic liquid. It was shown that this column has high rates of hydrogen bonding and π - π interactions in terms of the Abraham model. At the same time, acridinium ionic liquid, which is, like similar phases based on ionic liquids, highly polar, exhibits increased selectivity in retaining aromatic compounds (aromatic hydrocarbons, phenols and similar compounds) and most oxygen-containing compounds and bases in comparison with aliphatic hydrocarbons. This allows the separation of complex mixtures, including aromatic hydrocarbons, and oxygen-containing compounds. The high thermal stability of the developed column was also shown, comparable to analogues based on quinolinium ionic liquids, but unlike them, it has a different selectivity due to higher values of π - π interactions and hydrogen bonding according to the donor mechanism. This opens up new prospects for the use of this column and, probably, its analogues, for the separation of complex mixtures containing polar aromatic and oxygen-containing compounds, especially in two-dimensional chromatography. These features were shown based on the example of the separation of a complex mixture by two-dimensional gas chromatography, where this column acted as the second column.

Keywords: ionic liquids, capillary chromatography, two-dimensional chromatography

Acknowledgments: the work was carried out within the framework of the state task of the Institute of Catalysis of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Shashkov M.V., Dolgushev P.A. New ionic liquid based stationary phase for 2D gas chromatography with high selectivity to aromatic analytes. *Sorbtionnyye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 236-243. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11147>

Введение

Ионные жидкости (ИЖ) являются уникальным классом веществ, демонстрирующим свойства присущие органическим и неорганическим соединениям. Как правило, они состоят из органического катиона (например, алкил-имидазолий, алкил-аммоний, алкил-фосфоний) и органического или неорганического аниона (NTf_2^- , TfO^- , Br^- , PF_6^- , BF_4^- , и др.) [1]. По этой причине, с одной стороны, ИЖ проявляют свойства органических полярных растворителей. С другой стороны, благодаря ионной структуре ИЖ обладают такими свойствами как высокая вязкость и низкое давление насыщенных паров, что характерно для неорганических соединений. Благодаря этим свойствам они нашли применение в областях, которые относятся к органическому синтезу, электрохимии (в основном в качестве электролитов для аккумуляторов), а также для процессов разделения, включая экстракцию и хроматографию [1-3]. Кроме того, некоторые из ИЖ нашли промышленное

применение. Недавно было показано, что ИЖ возможно использовать в качестве неподвижных жидких фаз (НЖФ) для капиллярной газовой хроматографии [4]. Кроме того, ИЖ обладают уникальными по сравнению с традиционными НЖФ разделительными свойствами, которые можно изменять в широких пределах путем варьирования структуры катионов и использования различных анионов [5].

Одним из направлений такого направленного изменения свойств является создание НЖФ на основе ИЖ, которые демонстрируют высокое разрешение ароматических соединений. Было показано, что новый класс катионов с конденсированной ароматической системой – алкил-хинолиниевые [6], по сравнению неконденсированными аналогами – пиридиниевыми [5] позволяют значительно улучшить разделение ароматических соединений, к примеру, сложных продуктов пиролиза и автомобильного бензина. Такие свойства фаз могут быть перспективными при решении аналитических задач экологии,

в анализе пищевых продуктов, а также задач, связанных с анализом продуктов пиролиза, где необходимо разделение фенольных соединений в сложных полярных матрицах.

В настоящей работе реализуется подход, позволяющей далее эти преимущества углубить и достигнуть еще большего разрешения ароматических соединений. Для этого предложено использовать акридиновую систему. Акридиниевый катион, в отличие от хинолиниевых содержит не одно, а два бензольных кольца, что должно существенно увеличить π - π -взаимодействия. Кроме того, предлагается вместо алкильного использовать бензильный заместитель, который даст дополнительный вклад в увеличении разрешения ароматических соединений.

Данная работа посвящена исследованию свойств капиллярной колонки с новой неподвижной фазой на основе бензилакридиниевой ИЖ с бистрифлимидным анионом. Колонка охарактеризована с точки зрения полярности, селективности и термостабильности. Показана возможность колонки с данной фазой для решения задачи разделений сложной смеси методом двумерной хроматографии (ГХ×ГХ).

Экспериментальная часть

Реактивы. Реактивы для синтеза: литий бис(трифторметилсульфонил)имид (LiNTf₂) (99%, Acros), остальные AlfaAesar: акридин (98%), бромистый бензил (98%), 1,6-дибромгексан (97%),

1,9-дибромнонан (97%), 1,4-дибромбутан (97%). Растворители особой чистоты для синтезов и нанесения фазы: дихлорметан, этилацетат.

Синтез ионных жидкостей. ИЖ *бензилакридиний бис(трифторметилсульфонил)имид* (рис. 1) была синтезирована согласно процедуре, аналогичной описанной для алкилхинолиниевой ИЖ [6]. Синтезированная ИЖ охарактеризована с помощью ¹H, ¹³C ЯМР, что подтвердило целевую структуру и чистоту 97%.

¹H NMR: 9.94 (s, 1H, H-9), 8.58 (d 8.4 Hz, 2H, H-1,8), 8.30 (pseudo-d 4Hz, 4H, H-3,4,5,6), 7.94 (m, 2H, H-2,7), 7.36 (m, 3H, meta-Ph, para-Ph), 7.08 (m, 2H, ortho-Ph), 6.58 (s, 2H, CH₂);

¹³CNMR: 152.15 (CH,1C, C-9), 141.62 (C,2C, C-11,14), 140.28 (CH,2C, C-3,6), 132.48 (CH,2C, C-1,8), 132.40 (C,1C, Ph), 129.71 (CH,2C, meta-Ph), 129.04 (CH,1C, para-Ph), 128.24 (CH,2C, C-2,7), 126.82 (C,2C, C-12,13), 125.40 (CH,2C, ortho-Ph), 119.71 (CF₃, q 321 Hz,2C), 117.91 (CH,2C, C-4,5), 54.42 (CH₂,1C).

Приготовление капиллярных колонок. Колонки готовили с использованием статического метода низкого давления. Фазу наносили на капилляр из плавленного кварца с внутренним диаметром 0.25 мм, в качестве растворителя для ИЖ использовали дихлорметан [6]. Полярность и селективность оценивали на колонке с толщиной пленки 0.2 мкм и длиной 10 м. Тестирование колонок и измерение хроматографических характеристик проводили с помощью хроматографа Agilent 7890A с масс-

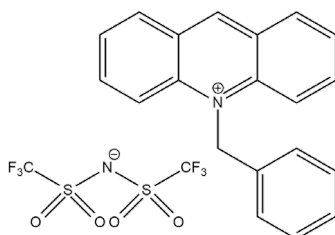


Рис. 1 Структурная формула бензилакридиний бис(трифторметилсульфонил)имид
Fig. 1 Structural formula of Benzylacridinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide



спектрометрическим детектором (Agilent 7000B), температура детектора 250°C, электронная ионизация, режим сканирования 40-400 m/z, в качестве газ-носителя использовался гелий. Для получения разделения методом двумерной хроматографии приготовлена колонка с толщиной пленки 0.2 μm и длиной 25 м

Измерение полярности и параметров модели Абрахама. Для измерений индекса полярности по Мак-Рейнольдсу проводили хроматографирование смеси тестовых веществ Мак-Рейнольдса при температуре 120°C: бензол, бутанол-1, пентанон-2, нитропропан-1, пиридин. Рефером мертвого времени служил n-пентан, для вычисления индексов Ковача измеряли удерживание нормальных углеводородов C₁₀-C₁₆. Значения полярности определяли в соответствии со шкалой полярности, использованной в [7], где за нулевое значение полярности принимается сквалан, за 100 – фаза SPB-IL100 (Supelco). Для расчета параметров модели Абрахама получали данные удерживания для 35 тестовых веществ, дескрипторы (E, S, A, B, L) для которых взяты из [8]. Температуры измерений: 100°C, 120°C, 140°C. Для расчета параметров модели (e, s, a, b, l) применялся метод множественной линейной регрессии с использованием ПО STATISTICA-10.0.228.8.

Исследование термической стабильности и получение разделений. Исследование термостабильности и получение примеров разделений проводили на хромато-масс-спектрометре Agilent 7000B с детектором на основе тройного квадруполя. Во всех случаях, скорость потока (He) составляла 0.8 см³/мин. Детектирование проводили в режиме сканирования в диапазоне масс 40-500 m/z. Энергия ионизации 70 эВ.

Для исследования термостабильности термостат колонок нагревали по программе 200°C (10 мин) – далее 3°C/мин до

250°C (10 мин), далее до 300°C (15 мин). Температура испарителя 300°C.

ГХ×ГХ – разделение газойля каталитического крекинга проведено при следующих условиях: первая колонка акридиниевая ИЖ 25 м x 0.25мм x 0.2 μm вторая колонка – HP-5 5м x 0.25мм x 0.25 μm . Температурная программа термостата колонок: 90°C (0мин), далее программирование со скоростью 3°C/мин до конечной температуры 300°C. Температура испарителя 300°C. Скорость потока через первую колонку 0.7 см³/мин, через вторую – 40 см³/мин.

Обсуждение результатов

Чтобы произвести оценку разделительных свойства новых НЖФ, требуется их характеристика с точки зрения полярности и селективности. Система Мак-Рейнольдса [9] является наиболее распространенным и простым способом для оценки полярности фазы. Данная система позволяет сравнить полярность новой фазы с уже известными. При решении задач хроматографического анализа использование данного подхода оказывается очень удобным, особенно благодаря скорости его использования.

Для изучаемой в работе акридиниевой ИЖ полярность по Мак-Рейнольдсу оказалось равной 83 единицы. Это означает, что данная колонка является высокополярной. При этом, как оказалось, полярность данной ИЖ выше, чем для всех изученных ранее 6-метилхинолиниевых ИЖ (табл.1, последний столбец). Таким образом, можно сделать вывод, что данная фаза будет перспективна для создания колонок предназначенных для ряда задач, где требуется достигнуть высокой селективности среди полярных соединений.

Тем не менее, система Мак-Рейнольдса является сравнительной. Такой подход не обеспечивает достоверной оценки всех типов

Таблица 1. Параметры модели Абрахама (e, s, a, b, l) и полярность по Мак-Рейнольдсу бензил-акридиниевой ИЖ с сравнением с хинолиниевыми
 Table 1. Abraham model parameters (e, s, a, b, l) and McReynolds polarity of benzyl-acridinium IL compared with quinolinium

Ионная жидкость	Температура (°C)	Параметры модели					Статистика		Полярность (P)
		e	s	a	b	l	k	F	
6MQHex [6]	100	0.12	1.65	1.32	0.33	0.50	0.999	4165	64
	120	0.09	1.62	1.18	0.23	0.45	0.999	3315	
	140	0.09	1.61	1.09	0.09	0.41	0.999	4057	
6MQBu [6]	100	0.26	1.59	1.29	0.45	0.47	0.999	2891	77
	120	0.23	1.58	1.15	0.41	0.42	0.999	2842	
	140	0.22	1.56	1.04	0.11	0.38	0.998	2575	
6MQPr [6]	100	0.36	1.60	1.39	0.63	0.47	0.999	4164	79
	120	0.27	1.70	1.28	0.59	0.37	0.999	3344	
	140	0.25	1.61	1.14	0.49	0.32	0.999	3034	
Benzyl Acrydine	100	0.41	1.19	1.40	0.90	0.43	0.999	2015	83
	120	0.39	1.17	1.25	0.80	0.39	0.999	1876	
	140	0.32	1.21	1.05	0.74	0.37	0.999	2023	

межмолекулярных взаимодействий со стороны фазы, отвечающих за удерживание различных классов веществ, что может приводить к некорректным оценкам. Исходя из этого, Михаелем Абрахамом была предложена модель линейной зависимости свободной энергии (ЛЗСЭ), которая учитывает индивидуальные вклады всех типов взаимодействий со стороны фазы в удерживание вещества [10].

В основе модели лежит предположение, что свободная энергия взаимодействия между веществом и фазой зависит линейно от набора индивидуальных типов взаимодействий. При заданной температуре вместо энергии используют логарифм константы распределения (K_L):

$lgK_L = c + eE + sS + aA + bB + lL(1)$
 где K_L – коэффициент распределения между подвижной и неподвижной фазой, c – модельная константа. Заглавные буквы (E, S, A, B, L), называемые дескрипторами, являются коэффициентами, учитывающие вклад в межмолекулярные взаимодействия со стороны аналитов. Маленькие буквы – параметры модели (учитывают вклад неподвижной фазы). Параметр (e)

отвечает за π - π и n - π взаимодействия, (s) – за диполь-дипольные (в том числе и индукционные). (a) и (b) являются оценкой вклада фазы в образование обратимой водородной связи, причем (a) отвечает за силы, где фаза выступает в качестве акцептора водорода, а (b) – в качестве донора. (l) учитывает дисперсионную составляющую межмолекулярных взаимодействий.

Данная система удобна не только как способ характеристики неподвижных фаз с точки зрения селективности к определенным классам соединений, но она также удобна как способ оценки различных типов взаимодействий, возникающих между ИЖ и взаимодействующими с ней молекулами. Результаты оценки бензил-акридиновой ИЖ по Абрахаму в сравнении с ранее изученными хинолиниевыми представлены в табл. 1, где при температурах 100, 120, 140°C приведены параметры различных типов межмолекулярных взаимодействий, характерных для изученных ИЖ. Из таблицы 1 видно, что наибольшие значения имеют параметры дипольных взаимодействий (s) и водородной связи (a, b). Также значителен вклад π - π

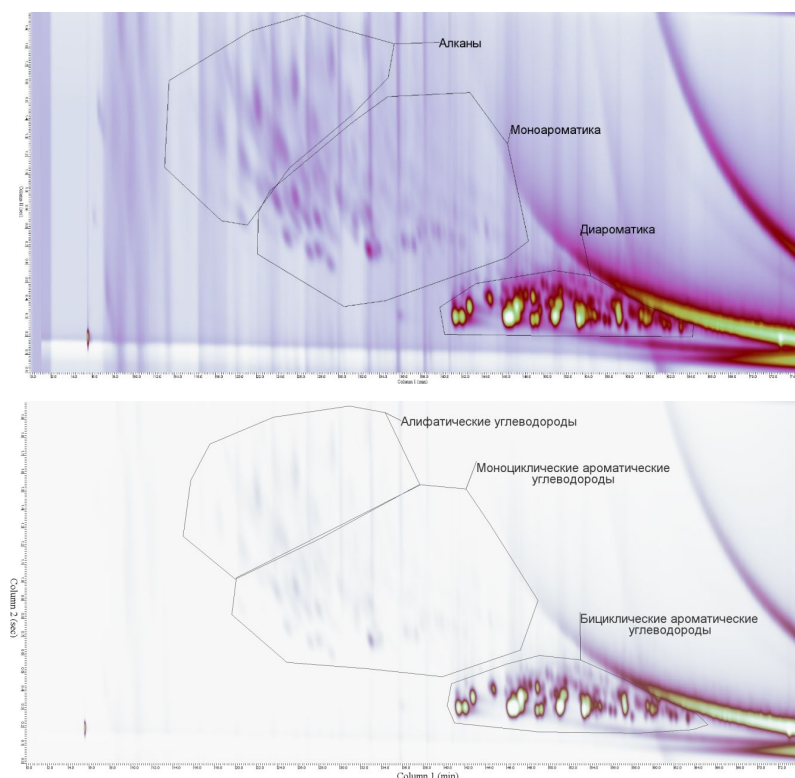


Рис. 2. Разделение газойля каталитического крекинга на колонке с бензил-акридиниевой ИЖ.
Fig. 2. Separation of catalytic cracking gas oil on a column with benzyl-acridinium IL

взаимодействий (e). Можно наблюдать ряд важных отличий при сравнении изучаемой акридиниевой ИЖ с хинолиниевыми. В первую очередь более высокое разрешение ароматических соединений (e) и параметры водородной связи донорного типа (b). При этом для дипольных взаимодействий (s) характерны значительно более низкие значения. Из выше сказанного можно сделать вывод, что акридиниевая ИЖ являясь, как и аналоги высокополярной НЖФ, будет проявлять повышенную селективность при разделении ароматических соединений (ароматические углеводороды, фенолы и пр.), а также к большинству кислородсодержащих соединений и основаниям.

Термостабильность. Были проведены измерения уровня фонового тока колонки при нагреве её в диапазоне 200–250–300°C, чтобы сравнить свойства термостабильности исследуемой ИЖ с известными НЖФ. Были получены результаты, что при нагреве до 300°C не наблюдается

значительного увеличения фонового тока. Абсолютный уровень фонового тока при нагреве оказался сопоставим с 6-метилхинолиниевой ИЖ [6], для которой ранее было показано, что она является заведомо термостабильной до 300°C и пригодна для решения практических задач высокотемпературного разделения.

Подобная термическая стабильность необходима для разделения смесей нефтепродуктов, содержащих различные классы углеводородов. Пример такого разделения до максимальной температуры 300°C приведен на рис. 2. Можно увидеть, что использование в качестве первой колонки с бензил-акридиниевой ИЖ приводит к достижению хорошей селективности при разделении ароматических углеводородов, в частности бициклических ароматических углеводородов, которая составляет максимальную долю в данной смеси (табл. 2). К сожалению, эффективность для неароматических углеводородов, оказалась не столь высокой,

Таблица 2. Фракционный состав образца представленного на рис. 2.

Table 2. The fractional composition of the sample shown in Fig. 2.

Фракция	Алифатические УВ	Моноциклические ароматические УВ	Бициклические ароматические УВ
Бензиновая	0.00	0.00	0.00
Дизельная	15.85	19.04	58.77
ВГО	1.08	0.72	4.54
Общее содержание	16.93	19.75	63.31

что проявляется в виде размытия алифатических углеводородов. Вероятно, данную проблему можно решить более тщательным подбором условий, тем более что потенциал селективности позволяет значительно увеличить начальную температуру и скорость программирования.

Заключение

Представленная ИЖ, синтезированная на основе бензил-акридиниевого катиона, является еще одной новой ступенью на пути разработки новых классов неподвижных фаз на основе ИЖ. Как и свои предшественники она обладает высокой полярностью, высокой термической стабильностью (до 300°C), но в отличие от них имеют другую

Список литературы

1. Han X., Armstrong D.W. Ionic liquids in separations // *Acc. Chem. Res.* 2007. Vol. 40, no 11. P. 1079-1086.
2. Shashkov M.V., Sidelnikov V.N. A capillary gas chromatographic analysis of the characteristics of ionic liquid films // *J. Struct. Chem.* 2014. Vol. 55, no 5. P. 980-985.
3. Kolobova E., Kartsova L., Kravchenko A., Bessonova E. Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines // *Talanta.* 2018. Vol. 188, no May. P. 183-191.
4. Yao C., Anderson J.L. Retention characteristics of organic compounds on molten salt and ionic liquid-based gas chromatography stationary phases // *J. Chromatogr. A.* 2009. Vol. 1216, no 10. P. 1658-1712.
5. Шашков М.В., Сидельников В.Н.,

селективность, обусловленную более высокими значениями π - π -взаимодействий и водородной связи по донорному механизму. Это открывает новые перспективы для использования этой колонки и, вероятно, её аналогов, для разделения сложных смесей, содержащих полярные ароматические и кислородсодержащие соединения, особенно в двумерной хроматографии.

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.

Заикин П.А. Селективность неподвижных фаз на основе пиридиниевых ионных жидкостей для капиллярной газовой хроматографии // *Журнал Физической Химии.* 2014. Т. 88, № 4. С. 714-719.

6. Shashkov M.V., Sidelnikov V.N., Bratchikova A.A. New Stationary Ionic Liquid Phases with Quinolinium Cations for Capillary Gas Chromatography // *Anal. Lett. Taylor&Francis.* 2019. Vol. 53, no 1. P. 84-101.

7. Supelco; Sigma-Aldrich. Supelco Ionic Liquid GC Columns: Introduction to the Technology // *Supelco Ion. Liq. GC Columns.* 2014. P. 42.

8. Ulrich S., Brown T.N., Watanabe N., Bronner G., Abraham M.H., Goss, K.-U. N. E. UFZ-LSER database v 3.2 [Internet]. Leipzig, Deutschland, Helmholtz Zentrum für Umweltforschung UFZ, 2017.



9. McReynolds W.O. Characterization of Some Liquid Phases // *J. Chromatogr. Sci.* 1970. Vol. 8, no 12. P. 685-691.

10. Abraham M.H., Poole C.F., Poole S.K. Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1999. Vol. 842, no 1-2. P. 79-114.

References

1. Han X., Armstrong D.W. Ionic liquids in separations. *Acc. Chem. Res.* 2007; 40(11): 1079-1086. <https://doi.org/10.1021/ar700044y>

2. Shashkov M.V., Sidelnikov V.N. A capillary gas chromatographic analysis of the characteristics of ionic liquid films. *J. Struct. Chem.* 2014; 55(5): 980-985 <https://doi.org/10.1134/S002247661405028X>

3. Kolobova E., Kartsova L., Kravchenko A., Bessonova E. Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines. *Talanta.* 2018; 188: 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.057>

4. Yao C., Anderson J.L. Retention characteristics of organic compounds on molten salt and ionic liquid-based gas chromatography stationary phases. *J. Chromatogr. A.* 2009; 1216(10): 1658-1712. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.001>

5. Shashkov M.V., Sidelnikov V.N.,

Zaikin P.A. Selectivity of stationary phases based on pyridinium ionic liquids for capillary gas chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry A.* 2014; 88: 717-721.

<https://doi.org/10.1134/S0036024414040268>

6. Shashkov M.V., Sidelnikov V.N., Bratchikova A.A. New Stationary Ionic Liquid Phases with Quinolinium Cations for Capillary Gas Chromatography. *Anal. Lett. Taylor&Francis.* 2019. 53(1): 84-101. <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1638393>

7. Supelco; Sigma-Aldrich. Supelco Ionic Liquid GC Columns : Introduction to the Technology. *Supelco Ion. Liq. GC Columns.* 2014; 42.

8. Ulrich S., Brown T.N., Watanabe N., Bronner G., Abraham M.H., Goss K.-U. N., E. UFZ-LSER database v 3.2 [Internet]. Leipzig, Deutschland, Helmholtz Zentrum für Umweltforschung UFZ, 2017.

9. McReynolds W.O. Characterization of Some Liquid Phases // *J. Chromatogr. Sci.* 1970. Vol. 8, № 12. P. 685-691. <https://doi.org/10.1093/chromsci/8.12.685>

10. Abraham M.H., Poole C.F., Poole S.K. Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1999; 842(1-2): 79-114. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00930-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00930-3)

Информация об авторах / Information about the authors

М.В. Шашков – к.х.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова» СО РАН, Новосибирск, Россия

П.А. Долгушев – аспирант ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова» СО РАН, Новосибирск, Россия

M.V. Shashkov – Candidate of Chemical Sciences, Senior Scientist of Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Research Center Institute of Catalysis. G.K. Boreskov SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: shashkov@catalysis.ru, ORCID: 0000-0001-9022-1525

P.A. Dolgushev – Ph.D. student of Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Research Center Institute of Catalysis. G.K. Boreskov SB RAS Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: Dolgushevpa@catalysis.ru, ORCID: 0000-0002-7129-6254

Статья поступила в редакцию 1.06.2022; поступила после доработки 19.01.2023; одобрена после рецензирования 24.01.2023; принята к публикации 25.01.2023.
The article was submitted 11.12.2022; received after revision on 19.01.2023; approved after reviewing 24.01.2023; accepted for publication 25.01.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 10.17308/sorpchrom.2023.23/11148

Он-лайн концентрирование с применением магнитного молекулярно импринтированного сорбента и ГХ-МС определение бисфенола А в природных средах

Александр Сергеевич Губин¹,

Алексей Алексеевич Кушнир¹, Павел Тихонович Суханов¹✉

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия,
pavel.suhanov@mail.ru ✉

Аннотация. В последнее время актуальны исследования, в которых предлагаются способы концентрирования различных веществ в динамических условиях с применением магнитных сорбентов.

В работе изучено концентрирование в динамических условиях с применением молекулярно импринтированного сорбента (Fe_3O_4 @МИП-БФА) с отпечатками бисфенола А (БФА) для его последующего определения в водах, почвах и донных отложениях на уровне ультрамикрочисел.

Разработана оригинальная стендовая установка, основанная на принципах он-лайн магнитной твердофазной экстракции. Установка включает колонку из боросиликатного стекла, заполненную Fe_3O_4 @МИП-БФА, который фиксируется двумя неодимовыми магнитами. По сравнению с применением одного магнита конструкция с двумя магнитами обеспечивает равномерность распределения сорбента по всему сечению колонки. Наибольшие коэффициенты концентрирования ($EF=3216$) и степень десорбции БФА из колонки достигаются соответственно при объемной скорости пропускания раствора (W) $2.0 \text{ см}^3/\text{мин}$ и при элюировании метанолом $W=0.4 \text{ см}^3/\text{мин}$.

Определение методом ГХ-МС БФА в концентратах из модельных сред обеспечивает высокую чувствительность разработанного способа определения БФА. При анализе модельных растворов, приготовленных в дистиллированной воде, предел обнаружения (ПО) составляет $0.3 \text{ нг}/\text{дм}^3$. При анализе речной воды ПО возрастает примерно в 2 раза. При анализе почв $\text{ПО}=2.2 \text{ нг}/\text{кг}$ сухой массы. Почвы по сравнению с водными объектами содержат большее количество мешающих компонентов, чувствительность способа снижается в 7-8 раз. Еще более загрязнены донные отложения, ПО возрастает более чем в 2 раза по сравнению с определением БФА в почвах.

Ключевые слова: он-лайн магнитная твердофазная экстракция, молекулярно импринтированный сорбент, бисфенол А, определение, вода, донные отложения, почва.

Для цитирования: Губин А.С., Кушнир А.А., Суханов П.Т. Он-лайн концентрирование с применением магнитного молекулярно импринтированного сорбента и ГХ-МС определение бисфенола А в природных средах // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 2. С. 244-254.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11148>

Original article

On-line concentration using a magnetic molecularly imprinted sorbent and GC-MS determination of bisphenol A in natural media

Aleksander S. Gubin¹, Aleksei A. Kushnir¹, Pavel T. Sukhanov¹✉

¹Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation,
pavel.suhanov@mail.ru ✉

Abstract. Studies that propose methods for concentrating various substances under dynamic conditions using magnetic sorbents are relevant.



In this study we investigated concentration under dynamic conditions using a molecularly imprinted sorbent ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIP-BPA}$) with imprints of bisphenol A (BPA) for its subsequent determination in waters, soils and bottom sediments at the level of ultra microquantities.

Designed, original stand installation, based on online magnetic solid phase extraction principles was developed. The installation includes a borosilicate glass column filled with $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIP-BPA}$, which is fixed with two neodymium magnets. In comparison with the use of a single magnet, the dual magnet design ensures that the sorbent is evenly distributed over the entire cross section of the column. The highest enrichment factors ($\text{EF}=3216$) and the degree of BPA desorption from the column were achieved for the volumetric filtration rate (W) $2.0 \text{ cm}^3/\text{min}$ and for $W=0.4 \text{ cm}^3/\text{min}$ for the elution with methanol.

The GC-MS determination of BPA in concentrates from model media ensures the high sensitivity of the developed method for the determination of BPA. For the analysis of model solutions prepared in distilled water, the limit of detection (LOD) is $0.3 \text{ ng}/\text{dm}^3$. In the analysis of river water, the LOD increases by about 2 times. In the analysis of soils, $\text{LOD}=2.2 \text{ ng}/\text{kg}$ dry wt. Soils, in comparison with water bodies, contain a greater amount of interfering components, the sensitivity of the method is reduced by 7-8 times. The bottom sediments are even more polluted, the LOD increases by more than 2 times in comparison with the determination of BPA in soils.

Keywords: online magnetic solid phase extraction, molecularly imprinted sorbent, bisphenol A, determination, water, bottom sediments, soil.

For citation: Gubin A.S., Kushnir A.A., Sukhanov P.T. On-line concentration using a magnetic molecularly imprinted sorbent and GC-MS determination of bisphenol A in natural media. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2023. 23(2): 244-254.* (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11148>

Введение

Для концентрирования органических токсикантов из различных сред применяются следующие методы: твердофазная экстракция (ТФЭ), экстракция «зелеными растворителями», *он-лайн* ТФЭ, магнитная ТФЭ и др. [1-6]. Одним из перспективных направлений при концентрировании различных соединений является применение сорбентов с магнитными свойствами, способных быстро и практически полностью отделяться из любых сред магнитной сепарацией. Для этого обычно применяются неодимовые магниты. В классической схеме пробоподготовки сорбент добавляют к анализируемому раствору, перемешивают до достижения сорбционного равновесия и далее, удерживая сорбент магнитом, отделяют раствор, отводят магнит, извлекают сорбент из сосуда и десорбируют из него аналит [2, 7].

Новые разработки направлены на возможность концентрирования с применением магнитных свойств сорбентов в динамических условиях. Простейшим устройством является проточная система для динамической сорбции солей кобальта в колонке, в которой слой магнитного сорбента удерживается одним магнитом [8]. Для концентрирования ионов

кобальта 100 мкл водной суспензии частиц Fe_3O_4 , покрытых Al_2O_3 , удерживают в колонке постоянным магнитом. Затем сорбент модифицируют пропусканием через него смеси лаурилсульфоната натрия и 1-(2-пиридилазо)-2-нафтола (ПАН). Далее через колонку пропускают анализируемый раствор. После достижения динамического равновесия комплекс кобальта с ПАН десорбируют этанолом и анализируют полученный концентрат.

Другие авторы считают такую систему недостаточно эффективной, поскольку под действием магнитных полей в сорбенте возможно образование каналов, поэтому рекомендуют использовать два магнита, установленных перпендикулярно друг другу (*on-line magnetic sorbent extraction*) [9]. Такая система применена для концентрирования и хемилюминисцентного определения ионов меди. Авторами предложена проточно-реакторная роботизированная микросистема, в которой для концентрирования применен иммобилизованный магнитом слой сорбента [10]. Система совмещает особенности классического концентрирования и проточного анализа. Анализируемым раствором заполняют микроячейку с микрошпалкой и иммобилизованным

магнитным сорбентом, функционализированным ПАН. При отведении магнита иммобилизованный сорбент отходит от стенок ячейки и перемешивается мешалкой. После завершения сорбции магнит прижимают к стенке микроячейки, сорбент иммобилизуется, раствор, содержащий комплекс иона меди и ПАН, отделяется и к нему добавляется смесь H_2O_2 и HNO_3 . Магниты вновь отводятся от стенок колонки, а сорбент перемешивается. Магниты возвращаются на исходные позиции и слой сорбента при этом фиксируется на стенке микроячейки. Затем раствор из ячейки сливают, к фиксированному слою сорбента добавляют люминол и все операции проводят снова. Далее сорбент удаляют из колонки потоком воды и определяют в нем ионы меди.

Системы, включающие два магнита, рекомендуются для проведения проточного анализа в автоматизированном формате. Одна из таких систем состоит из шприцевого насоса и шестиходового крана, переключающего потоки, и применена для определения ионов тяжелых металлов. В качестве сорбента применены магнитные частицы, функционализированные ионообменной смолой. Анализируемый раствор подают через трубки с внутренним диаметром 0.5 мм и объемом 0.4 см³ [11]. Для формирования концентрирующей *он-лайн* системы применяют кольцевой неодимовый магнит, окружающей микроколонку [12].

Также предлагается не фиксировать сорбент магнитами, а перемешивать его за счет поступательных движений двух магнитов по обе стороны от колонки (*magnetic-field-assisted on-line solid-phase extraction*). Способ применен для анализа остаточных количеств антибиотиков в воде [13, 14].

БФА относится к группе фенольных ксеноэстрогенов – химических веществ, разрушающих эндокринную систему (при попадании в организм образуются ложные половые гормоны) [20]. Он был обнаружен в детских бутылочках для

кормления, пластиковой посуде, консервированных напитках, водных объектах и почвах [20, 21]. Таким образом, важно разрабатывать селективные и чувствительные аналитические методы для обнаружения БФА в образцах окружающей среды и пищевых продуктов.

Цель работы – оценить возможность применения динамического концентрирования с применением магнитного молекулярно импринтированного сорбента (МИП) с отпечатками бисфенола А (БФА) для его определения в водах, почвах и донных отложениях на уровне ультрамикророколичеств.

Экспериментальная часть

Синтез МИП с отпечатками БФА ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ МИП-БФА), его характеристики и сорбционные свойства подробно изложены в работах [15, 16].

Приборы и материалы. Для динамического концентрирования разработана установка, в которой подачу растворов и растворителей в колонку проводили шприцевыми двухканальными ViVa (Vesta KL-702, Kelly Med, КНР) и перистальтическими (LOIP LS – 301, Россия) насосами.

Магнитный сорбент помещался в колонку из боросиликатного стекла (внутренний диаметр – 2 мм, длина – 1 м), выполненные по специальному заказу. Соединение всех частей системы осуществляли при помощи силиконовых трубок с внутренним диаметром 1 и 2 мм (Siliconium, РФ). Переключение потоков проводили ручными трехпозиционными кранами-переключателями – Interchim Valve 3-port Manual Flow Complete (LP Liquid Chromatography, Франция). Для подкисления и подщелачивания анализируемых проб применяли соответственно растворы HCl и NaOH , приготовленные из препаратов квалификации ч.д.а. Десорбцию БФА проводили метанолом, сорбент промывали *n*-гексаном (квалификации для хроматографии, Ленреактив, РФ).

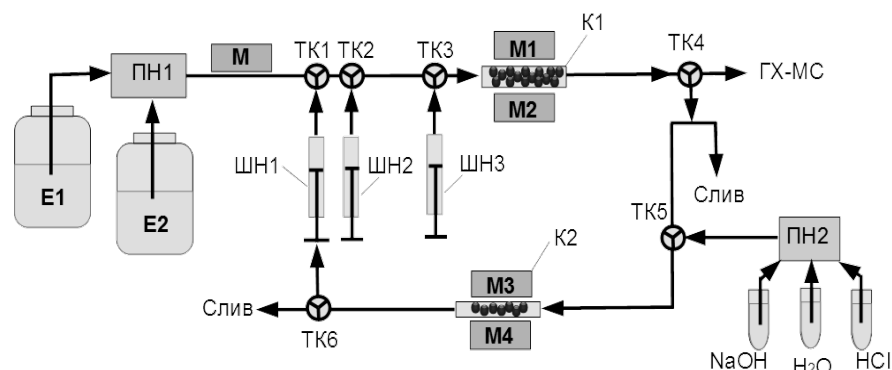


Рис. 1. Схема стендовой установки для сорбционного *онлайн* концентрирования с применением магнитного сорбента: E1 – емкость с анализируемым раствором; E2 – емкость с деионизированной водой; M, M1 – M4 – неодимовые магниты; K1 и K2 – колонки из боросиликатного стекла; TK1 – TK6 – трехходовые краны; ШН1 – ШН3 – шприцевые насосы; ПН1 и ПН2 – перистальтические насосы.

Fig. 1. Scheme of stand installation for sorption online concentration using a magnetic sorbent: C1 – container with the analysed solution; C2 – container with deionized water; M, M1 – M4 – neodymium magnets; C1 and C2 – borosilicate glass columns; TV1 – TV6 – three-way valves; SP1 – SP3 – syringe pumps; PP1 and PP2 are peristaltic pumps.

Схема динамического концентрирования БФА. Для динамического концентрирования БФА предложена установка, основанная на принципах *он-лайн* магнитной ТФЭ (рис. 1).

Перед проведением анализа колонку K1 заполняли сорбентом. Для этого шприцевым насосом ШН1 через трехходовой кран в колонку со скоростью $0.5 \text{ см}^3/\text{мин}$ подавали 0.1 г суспензии сорбента $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{МИП-БФА}$ в бидистиллированной воде. С обеих сторон колонки находились одинаковые неодимовые магниты M1 и M2 с магнитной индукцией 1.57 Тл . Один из магнитов устанавливали перпендикулярно по отношению к другому (рис. 2). Таким расположением и использованием одновременно двух магнитов достигается равномерность распределения сорбента и заполнение всего сечения колонки.

В емкость E1 помещали 100 см^3 анализируемой воды и перистальтическим насосом ПН1 с объемной скоростью (W) $2.0 \text{ см}^3/\text{мин}$ подавали ее в колонку. Для улавливания магнитных частиц, находящихся в воде, применялся магнит M. После прохождения участка колонки с магнитом раствор направлялся в колонку K1. Для снижения матричных эффектов

шприцевым насосом ШН3 сорбент промывали 1 см^3 *n*-гексана или *n*-гептана с $W=0.1 \text{ см}^3/\text{мин}$. Для десорбции БФА через трехходовой кран TK2 в колонку K1 шприцевым насосом ШН2 подавали 1.2 см^3 метанола ($W=0.4 \text{ см}^3/\text{мин}$). После десорбции элюат собирали, упаривали до 0.1 см^3 и анализировали методом ГХ-МС.

После десорбции через колонку K1 насосом ШН2 из емкости E2 прокачивали еще по 5 см^3 метанола и деионизированной воды. Магниты M1 и M2 эксцентриком [13] отводили от колонки K1 и пропускали через нее еще $5-8 \text{ см}^3$ бидистиллированной воды ($W=5 \text{ см}^3/\text{мин}$). Сорбент с потоком воды через трехходовой кран поступал в колонку K2, где удерживался магнитами и промывался последовательно 1 см^3 0.1 М NaOH , 1 см^3 0.1 М HCl и 10 см^3 бидистиллированной воды. Магниты M3 и M4 отводили от колонки K2, через нее пропускали воду и направляли регенерированный сорбент в шприцевой насос ШН1.

Построение выходных кривых динамической сорбции. Для построения выходных кривых сорбции 1.5 дм^3 раствора БФА с концентрацией $1 \text{ мкг}/\text{дм}^3$ подкисляли до pH 3 и пропускали через систему для динамического концентрирования с

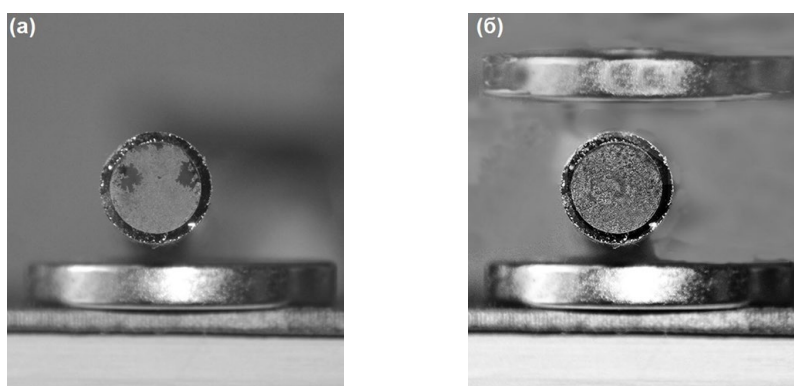


Рис. 2. Распределение сорбента в колонке при иммобилизации с применением одного (а) и двух (б) неодимовых магнитов после проведения сорбционного концентрирования при $W=3 \text{ см}^3/\text{мин}$. Макросъемка проведена фотоаппаратом Nikon D5200 с объективом Nikkor 70 – 300 мм 1:4.5-5.6 G (фокусное расстояние 300 мм).

Fig. 2. The distribution of the sorbent in the column during immobilization using one (a) and two (b) neodymium magnets after sorption concentration at $W=3 \text{ cm}^3/\text{min}$. The macro photography was done using Nikon D5200 camera with a Nikkor 70 lens – 300 mm 1:4.5-5.6 G (focal length 300 mm).

$W=1.5, 2.0, 3.0$ и $5.0 \text{ см}^3/\text{мин}$. Колонку заполняли 1 см^3 сорбента (в пересчете на сухое вещество). Десорбцию проводили 2 см^3 метанола. Строили выходные кривые сорбции в координатах $c/c_0 = f(V)$, где c и c_0 – концентрации БФА ($\text{мкг}/\text{см}^3$) на выходе и входе в систему соответственно; V – объем пробы, прошедший через колонку, см^3 . По ним находили объем до проскока $V_{10\%}$ (см^3) и коэффициент концентрирования в динамических условиях (K) [17]:

$$K = c_c/c_0,$$

$$c_{\text{ТВ}} = m/V_{\text{ТВ}},$$

где c_0 и c_c – концентрации аналита в исходном водном растворе и объеме сорбента ($\text{мг}/\text{см}^3$) в момент 10 %-ного проскока соответственно, $V_{\text{ТВ}}$ – объем сухого сорбента в колонке (см^3), m – масса аналита (мг), сорбированного твердой фазой из объема, соответствующего 10%-ному проскоку.

Рассчитывали коэффициент концентрирования (EF) как отношение исходной концентрации аналита к его концентрации после процедур сорбции, промывания n -гептаном (или n -гексаном) и упаривания.

Определение методом ГХ-МС. Концентрат вводили в узел ввода газового хроматографа Agilent 7890B GC System с масс-детектором Agilent 5977A MSD при

известных условиях [18]: объем пробы – 1.0 мкл , деление потока 30:1, колонка HP-5MS UI ($30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \times 0.25 \text{ мкм}$), фаза – (5% фенил)-метилполисилоксан. Газ-носитель – гелий ($1.0 \text{ см}^3/\text{мин}$), температура узла ввода пробы – 280°C , температура источника ионов – 250°C . Условия программирования температуры: стартовая 90°C в течение 1 мин, далее ее повышали со скоростью $3^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 150°C , $6^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 210°C и $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 280°C и удерживали 2 мин. Применялась ионизация с энергией электронов 70 эВ . В режиме мониторинга проводился контроль ионов с $m/z=213, 228$ и 270 .

Определение БФА в природных средах. Пробы природной воды подкисляли до pH 3, к образцам почв и донных отложений добавляли раствор NaOH (pH 12) и перемешивали 3 ч, затем отфильтровывали, отстаивали и подкисляли HCl до pH 3. Отбирали 100 см^3 и пропускали через стендовую установку.

Обсуждение результатов

Ранее установлено, что МИП с молекулярными отпечатками фенолов, содержащие функциональные группы, способны образовывать водородные связи, характеризуются наибольшей селективностью и обеспечивают максимальные

степени извлечения и величины предельной сорбции. Импринтинг-фактор $Fe_3O_4@MIP-BFA$ составляет 7.1 и при однократной сорбции извлекается более 96% БФА. Высокая намагниченность насыщения $Fe_3O_4@MIP-BFA$ (≈ 35 э.м.е./г) позволяет надежно закрепить сорбент по сечению колонки.

Конструкция колонки с двумя магнитами обеспечивает равномерное заполнение колонки по всему сечению по сравнению с применением одного магнита. При иммобилизации $Fe_3O_4@MIP-BFA$ одним магнитом в сечении колонки образуются полости, не заполненные сорбентом (рис. 2 а), либо плотность упаковки колонки неравномерна. При фиксации сорбента с применением двух магнитов, один из которых находится перпендикулярно другому, сорбент по сечению колонки распределяется практически равномерно и сохраняет такую структуру при пропускании раствора через слой сорбента (рис.2 б). В целом закономерность распределения сорбента по сечению колонки аналогична [9]. При элюировании со скоростью $W=1-5$ см³/мин сорбент не уносится из колонки, анализируемый раствор стабильно проходит через слой $Fe_3O_4@MIP-BFA$. При дальнейшем увеличении W унос сорбента из колонки начинается при $W 8.2-8.4$ см³/мин и существенно возрастает при W более 10 см³/мин.

При регулировании скорости пропускания анализируемого раствора руководствовались не только достигаемыми K в

динамических условиях, но и временем, затрачиваемым на процедуру концентрирования. При $W=1.5$ см³/мин, несмотря на высокие K , время проведения анализа увеличивается значительно (табл. 1). При W до 2 см³/мин K уменьшается лишь на 5%, но время анализа сокращается в 1.5 раза.

При дальнейшем возрастании W до 3 см³/мин K снижается на 38% (табл. 1). Вероятно, это обусловлено образованием каналов по бокам от центральной части колонки (в этих зонах магнитное поле наиболее слабое). При $W=5$ см³/мин показатели эффективности сорбции снижаются более чем в 6 раз. Таким образом, оптимальные условия динамического концентрирования обеспечиваются при $W=1.5$ см³/мин, для десорбции – $W=0.4$ см³/мин.

При концентрировании из модельных растворов, приготовленных в дистиллированной воде, и последующем анализе концентратов методом ГХ-МС предел обнаружения (ПО) БФА составляет 0.3 нг/дм³ (табл. 2). При анализе речной воды ПО в 2 раза выше. При анализе почв ПО=2.2 нг/кг сухой массы. Снижение чувствительности в 7-8 раз при анализе почв обусловлено содержанием в ней большого количества мешающих компонентов. Еще более загрязнены донные отложения, ПО возрастает более чем в 2 раза по сравнению с определением БФА в почвах.

Определению мешают гумусовые кислоты (гуминовые и фульвокислоты,

Таблица 1. Объемы до проскока ($V_{10\%}$, см³) и коэффициенты концентрирования (K , EF) при динамической сорбции фенолов в зависимости от скоростей пропускания растворов (объем сухого сорбента 1.0 см³)*

Table 1. Breakthrough volumes ($V_{10\%}$, cm³) and concentration factors (K , EF) during dynamic sorption of phenols depending on the flow rates of solutions (volume of dry sorbent 1.0 cm³)

Характеристики	Скорости пропускания растворов (см ³ /мин)			
	1.5	2.0	3.0	5.0
$V_{10\%}$	1022	945	635	117
K	822	782	489	78
EF	3529	3216	1895	405

*коэффициенты K рассчитаны с учетом объема метанола при десорбции

Таблица 2. Определение бисфенола А методом «введено-найдено» ($n=3, P=0.95$)
 Table 2. Determination of bisphenol A by the "introduced-found" method ($n=3, P=0.95$)

Введено, нг/дм ³ (нг/кг)	Найдено, нг/дм ³ (нг/кг)	$s_r, \%$	r^2	Предел обнару- жения, нг/дм ³ (нг/кг)	Предел определе- ния, нг/дм ³ (нг/кг)	Диапазон линейно- сти гра- дуиро- вочного графика, нг/дм ³ (нг/кг)
Дистиллированная вода						
1	1.1±0.2	14.5	0.995	0.3	0.9	0.9-600
5	4.9±0.5	12.7				
10	9.9±0.8	9.2				
50	50.1±3.9	7.0				
100	96.3±4.0	3.8				
500	500±21	2.9				
1000	**	**				
Речная вода						
1	*	*	0.993	0.7	2.1	2.1-700
5	4.5±0.6	12.9				
10	9.8±1.0	11.7				
50	49.5±4.0	7.1				
100	94.9±4.7	4.5				
500	507±29	3.1				
1000	**	**				
Почва						
1	-	-	0.991	5.0	15	15-1500
5	-	-				
10	*	*				
50	45.3±4.5	10.3				
100	92.2±7.1	8.2				
500	477±34	5.8				
1000	978±16	2.5				
Донные отложения						
1	-	-	0.990	12	40	40-1500
5	-	-				
10	*	*				
50	54.3±4.9	9.5				
100	102.2±7.2	7.2				
500	500±43	6.1				
1000	1008±18	2.2				

*ниже предела обнаружения; ** выходит за пределы интервала линейности градуировочного графика.

нефтепродукты, хлорфенолы и алкилфенолы). Для уменьшения их влияния через колонку пропускали *n*-гексан или *n*-гептан. Алкилфенолы и хлорфенолы хорошо растворимы в углеводородах и практически полностью удаляются из матрицы.

Хлорфенолы, гуминовые и фульвокислоты частично растворимы в углеводородных растворителях, при этом в значительной степени также десорбируются при промывании колонки. БФА плохо растворим в углеводородах, особенно в *n*-

Таблица 3. Сравнение разработанного способа *он-лайн* динамического концентрирования бисфенола А с аналогами.

Table 3. Comparison of the developed *online* dynamic concentration method of bisphenol A with analogues.

Способ концентрирования	Условия концентрирования	Условия десорбции	<i>EF</i>	Литература
Fe ₃ O ₄ @МИП	Объем сухого сорбента 1.0 см ³ , <i>W</i> =2 см ³ /мин, <i>V</i> =945 см ³	Метанол, 5 см ³ , <i>W</i> =0.4 см ³ /мин	3216	[данная работа]
ТФЭ с применением сорбента Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ , покрытого ионной жидкостью	<i>m</i> =0.10 г, <i>V</i> =40 см ³ , <i>t</i> =10 мин, pH=10	Метанол, <i>V</i> =4 см ³ , <i>t</i> =5 мин	25	[20]
Матричная ТФЭ с применением магнитных МУНТ	<i>m</i> =0.05 г, <i>V</i> =50 см ³ , <i>t</i> =15 мин, pH=10	Тетрахлорметан, <i>V</i> =35 мкл, <i>t</i> =1.5 мин	2268-2363	[21]
Он-лайн ТФМЭ с применением волокна с шаблоном из карбовакса	<i>m</i> =0.05 г, <i>V</i> =10 см ³ , <i>t</i> =60 мин, pH=6.8	Ацетонитрил/вода, 70:30, об.; <i>V</i> =10 см ³ , <i>t</i> =5 мин	1000	[22]
ТФЭ с применением сорбента P-CDP	<i>m</i> =0.02 г, <i>V</i> =8 см ³	Метанол, <i>V</i> =20 см ³	32	[23]
Жидкофазная МЭ с использованием экстракционных растворителей низкой плотности	<i>V</i> =320 см ³ , <i>t</i> =90 мин, pH=8	Экстрагент – толуол (60 мкл)	70.7	[24]
ТФЭ с применением сорбента МНАР/β-CDP	<i>m</i> =0.015 г, <i>V</i> =10 см ³ , <i>t</i> =5 мин, pH=7	Метанол, <i>V</i> =300 мкл, <i>t</i> =5 мин	91.2	[25]

гептане [19] и практически не десорбируется из Fe₃O₄@МИП-БФА.

Несмотря на длительное время *он-лайн* концентрирования с применением сорбента Fe₃O₄@МИП-БФА (более 450 мин) коэффициент *EF* более чем в 10-140 раз выше (табл. 3) по сравнению с ТФЭ, жидкофазной микроэкстракции (МЭ) и твердофазной микроэкстракцией (ТФМЭ) [20-25].

Заключение

Для динамического сорбционного концентрирования БФА предложена стендовая установка, в которой сорбент фиксируется при помощи двух неодимовых магнитов. За счет высокой намагни-

ченности насыщения сорбента концентрирование проводится с объемной скоростью *W* до 5 см³/мин. Динамическое концентрирование в сочетании с методом ГХ-МС позволяет проводить определение БФА на уровне 0.9, 2.1, 15 и 40 нг/дм³ или нг/кг в дистиллированной воде, речной воде, почве и донных отложениях соответственно.

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. Farahin Mohd Ali N., Sajid M., Ibrahim Thani Abd Halim W., Husaini Mohamed A., Nadhirah Mohamad Zain N., Kamaruzaman S., Suhaila Mohamad Hanapi N., Nazihah Wan Ibrahim W., Yahaya N. Recent advances in solid phase extraction methods for the determination of bisphenol A and its analogues in environmental matrices: An updated review. *Microchem. J.* 2023; 184: Article 108158. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108158>
2. Li W., Shi Y. Recent advances and applications of carbon nanotubes based composites in magnetic solid-phase extraction. *Trends. Analyt. Chem.* 2019; 118: 652-665. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.039>
3. Lim J.R., Chua L.S., Mustaff A.A. Ionic liquids as green solvent and their applications in bioactive compounds extraction from plants. *Process Biochem.* 2022; 122: 292-306. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.024>
4. Mohan B., Kamboj A., Virender Singh K., Priyanka Singh G., Pombeiro A.J.L., Ren P. Metal-organic frameworks (MOFs) materials for pesticides, heavy metals, and drugs removal: Environmental safety. *Sep. Purif. Technol.* 2023; 310: Article 123175. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.123175>
5. Rodriguez-Mozaz S., Lopez de Alda M.J., Barceló D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *J. Chromatogr. A.* 2007; 1152(1-2): 97-115. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.046>
6. Martínez D., Cugat M.J., Borrull F., Calull M. Solid-phase extraction coupling to capillary electrophoresis with emphasis on environmental analysis. *J. Chromatogr. A.* 2000; 902(1): 65-89. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00839-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00839-6)
7. Speltini A., Sturini M., Maraschi F., Profumo A. Recent trends in the application of the newest carbonaceous materials for magnetic solid-phase extraction of environmental pollutants. *Trends Environ. Anal. Chem.* 2016; 10: 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.03.001>
8. Wang Y., Luo X., Tang J., Hu X., Xu Q., Yang C. Extraction and preconcentration of trace levels of cobalt using functionalized magnetic nanoparticles in a sequential injection lab-on-valve system with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2012; 713: 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.022>
9. Anthemidis A.N., Xidia S., Giakisikli G. Study of bond Elut® Plexa™ PCX cation exchange resin in flow injection preconcentration system for metal determination by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta.* 2012; 97: 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04>
11. Ayala A., Takagai Y. On-line pseudo-stationary magnetic solid-phase extraction using magnetic cation exchange microparticles and its application to the determination of strontium. *J. Anal. At. Spectrom.* 2018; 33 (7): 1251-1255. <https://doi.org/10.1039/c8ja00088c>
12. Rocha P.S.M., Araujo A.S., Cassella R.J. Renewable column on-line magnetic preconcentration of Cd(II) using Fe₃O₄ nanoparticles functionalized with l-glutamine for determination by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta.* 2021; 222: Article 121519. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121519>
13. Sukhanov P.T., Gubin A.S., Kushnir A.A., Bogdaev A.A., Safonov S.V., Kretinin A. V. Recovery of phenols from waste waters by an encapsulated magnetic sorbent. *Chem. Pet. Eng.* 2018; 53(9-10): 674-678. <https://doi.org/10.1007/s10556-018-0401-7>
14. Ri H.-C., Piao J., Cai L., Jin X., Piao X., Jin X., Jon C.-S., Liu L., Zhao J., Shang H.-B., Li D. A reciprocating magnetic field assisted on-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of trace tetracyclines in water. *Anal. Chim. Acta.*



- 2021; 1182: Article 338957. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338957>
15. Gubin A.S., Kushnir A.A., Sukhanov P.T. Sorption concentration of phenols from aqueous media by magnetic molecularly imprinted polymers based on N-vinylpyrrolidone (part 2). *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022; 22(3): 274-283. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9334> (in Russ.)
16. Gubin A.S., Kushnir A.A., Sukhanov P.T. Sorption concentration of phenols from aqueous media by magnetic molecularly imprinted polymers based on N-vinylpyrrolidone. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2021; 21 (3): 326-335. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3466> (in Russ.)
17. Kushnir A.A., Sukhanov P.T., Churilina E.V., Shatalov G.V. Dynamic sorption of nitrophenols from aqueous solutions by polymers based on N-Vinylpyrrolidone. *Russ. J. Appl. Chem.* 2014; 87(5): 579-584. <https://doi.org/10.1134/S1070427214050073>
18. Kotowska U., Kapelewska J., Sturgulewska J. Determination of phenols and pharmaceuticals in municipal wastewaters from Polish treatment plants by ultrasound-assisted emulsification-microextraction followed by GC-MS. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014; 21(1): 660-673. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1904-6>
19. Van Rijn J.A., Guijt M.C., Bouwman E., Drent E. Selective O-allylation of bisphenol A: toward a chloride-free route for epoxy resins. *Appl. Organomet. Chem.* 2010; 25(3): 207-211. <https://doi.org/10.1002/aoc.1743>
20. Chen S., Chen J., Zhu X. Solid phase extraction of bisphenol A using magnetic core-shell ($\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$) nanoparticles coated with an ionic liquid, and its quantitation by HPLC. *Microchim. Acta.* 2016; 183(4): 1315-1321. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1757-z>
21. Li C., Wang Z., Sun A., Liu R., Diao C. Magnetic multi-walled carbon nanotubes matrix solid-phase dispersion with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of ultra-trace bisphenol A in water samples. *Chromatographia*. 2017; 80(8): 1189-1197. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3332-0>
22. Kim D., Han J., Choi Y. On-line solid-phase microextraction of triclosan, bisphenol A, chlorophenols, and selected pharmaceuticals in environmental water samples by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 405(1): 377-387. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6490-9>
23. Li Y., Lu P., Cheng J., Wang Q., He C. Simultaneous solid-phase extraction and determination of three bisphenols in water samples and orange juice by a porous β -cyclodextrin polymer. *Food Anal. Methods*. 2017; 11(5): 1476-1484. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1131-8>
24. Shariati S., Yekeh Falah K., Saleh A., Molaei S. Extraction and preconcentration of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in aqueous solutions using microfunnel supported liquid-phase microextraction prior to high performance liquid chromatography. *J. Iran. Chem. Soc.* 2020; 18(4): 887-892. <https://doi.org/10.1007/s13738-020-02077-9>
25. Bayatloo M.R., Nojavan S. Rapid and simple magnetic solid-phase extraction of bisphenol A from bottled water, baby bottle, and urine samples using green magnetic hydroxyapatite/ β -cyclodextrin polymer nanocomposite. *Microchem. J.* 2022; 175: Article 107180. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107180>

Информация об авторах / Information about the authors

А.С. Губин – к.х.н., доцент кафедры технологии органических соединений, переработки полимеров и техносферной безопасности, ВГУИТ, Воронеж, Россия

A.S. Gubin – Ph.D., Associate Professor, Department of Compound Technology, Polymer Converters and Technosphere Safety, VSUIT, Voronezh, Russian Federation, e-mail: goubinne@mail.ru



А.А. Кушнир – к.х.н., доцент кафедры технологии органических соединений, переработки полимеров и техносферной безопасности, ВГУИТ, Воронеж, Россия

П.Т. Суханов – д.х.н., профессор кафедры физической и аналитической химии, ВГУИТ, Воронеж, Россия

A.A. Kushnir – Ph.D., Associate Professor, Department of Compound Technology, Polymer Converters and Technosphere Safety, VSUIT, Voronezh, Russian Federation, e-mail: kushnir_aleksei@mail.ru

P.T. Sukhanov – professor, doctor of science (chemistry), Department of Physical and Analytical Chemistry, VSUIT, Voronezh, Russian Federation, e-mail: pavel.suhanov@mail.ru

Статья поступила в редакцию 21.02. 2023; одобрена после рецензирования 17.04. 2023; принята к публикации 19.04. 2023.

The article was submitted 21.02. 2023; approved after reviewing 17.04.2023; accepted for publication 19.04.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 631.4

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11149

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в количественном анализе гидроксикоричных кислот растений, произрастающих в Российской Федерации

Евгения Владимировна Компанцева^{1✉}, Алексей Иванович Сливкин²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волг ГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия, dskompanceva@mail.ru[✉]

²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. В настоящее время ведущее место в контроле качества лекарственных средств и изучении растительного сырья занимает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. За последние годы накопился большой объем информации по исследованию растений, произрастающих или культивируемых на территории Российской Федерации, для выявления гидроксикоричных кислот. Целью настоящего обзора является систематизация сведений по использованию метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения количественного содержания гидроксикоричных кислот в растениях, произрастающих или культивируемых на территории Российской Федерации. Проведена систематизация научных исследований, опубликованных в научных журналах и материалах конференций, проводимых в РФ. Анализ этих исследований показал, что российские ученые за последние 15 лет стали широко использовать метод ВЭЖХ для определения количественного содержания гидроксикоричных кислот в растительном сырье. Почти все работы выполнены на зарубежном оборудовании и в анализе успешно используются подвижные фазы растворителей как для изократического, так и градиентного режима элюирования. В опубликованных 50 источниках литературы приведены результаты поиска гидроксикоричных кислот в растительном сырье около 150 видов растений. В качестве сырья преимущественно использовалась трава или листья растений и почти во всех изучаемых растениях обнаружена хлорогеновая кислота. Наибольшее ее количество содержат плоды некоторых видов *Berberis*, листья *Parasenecio hastatus* (L.) H. Koyama, листья *Nepeta cataria* L., трава *Galeopsis bifida* L., листья *Cynara cardunculus* L. Представляют интерес и растения, содержащие розмариновую кислоту – *Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L., *Majorana hortensis*, *Mentha spicata* L., *Artemisia santonica*, *Origanum vulgare* и кофейную кислоту – листья *Arctium tomentosum* Mill. В градиентном режиме элюирования определяли содержание гидроксикоричных кислот в *Prunella vulgaris* L., *P. Laciniata* (L.) L. и *P. grandiflora* (L.) Turra. При этом, доля раствора В (смесь ацетонитрил - метанол - вода с хлорной кислотой в соотношении 40:40:20, pH 2.5) в смеси с раствором А (водный раствор хлорной кислоты, pH 1.8) возрастала от 0% до 100% в течение 80 минут, при температуре 30°C. Найдены кофейная кислота (следы) и розмариновая кислота (до 2.9%) [33].

Данные растения могут служить потенциальными источниками для создания новых высокоэффективных лекарственных средств. Однако с этой целью необходимо иметь данные о динамике накопления гидроксикоричных кислот в зависимости от времени года, места произрастания, сроков и условий заготовки, хранения растения. Ввиду отсутствия таких данных, необходимы исследования по нормированию количества гидроксикоричных кислот в потенциальном растительном сырье, обладающем их высоким содержанием.

Ключевые слова: растительное сырье, Российская Федерация, гидроксикоричные кислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ.

Для цитирования: Компанцева Е.В., Сливкин А.И. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в количественном анализе гидроксикоричных кислот растений, произрастающих в Российской Федерации // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 255-268 <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11149>



Original article

High performance liquid chromatography in the quantitative analysis of hydroxycinnamic acids in plants growing in the Russian Federation

Evgeniya V. Kompantseva¹✉, Alexey I. Slivkin²

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

²Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Abstract. Currently, high performance liquid chromatography method has a leading position in drug quality control and study of plant material. In recent years, a large amount of information on the study of plants growing or cultivated on the territory of the Russian Federation for the identification of hydroxycinnamic acids has been accumulated. The purpose of this review is systematization of information on the use of high performance liquid chromatography method for the determination of the quantitative content of hydroxycinnamic acids in plants growing or cultivated on the territory of the Russian Federation. The systematization of scientific research published in scientific journals and abstracts of conferences performed in the Russian Federation was performed. The analysis of these studies showed that Russian scientists over the past 15 years started widely use the HPLC method for the determination of the quantitative content of hydroxycinnamic acids in plant material. Almost all studies were performed using foreign equipment, and mobile phases of solvents were successfully used in the analysis for both isocratic and gradient elution modes. The results of the search of hydroxycinnamic acids in plant raw material of about 150 plant species were published 50 literature sources. Grass or leaves of plants were mainly used as raw material, and chlorogenic acid was found in almost all the plants studied. The highest amount of chlorogenic acid was found in fruits of some *Berberis* species, leaves of *Parasenecio hasstatus* (L.) H. Koyama, *Nepeta cataria* L. leaves, *Galeopsis bifida* L. grass, *Cynara cardunculus* L. leaves. Plants containing rosmarinic acid – *Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L., *Majorana hortensis*, *Mentha spicata* L., *Artemisia santonica*, *Origanum vulgare* and plants containing caffeic acid - *Arctium tomentosum* Mill. leaves are also promising. In the gradient elution mode, the content of hydroxycinnamic acids in *Prunella vulgaris* L., *P. laciniata* (L.) L. and *P. grandiflora* (L.) Turra. was determined. At the same time, the proportion of solution B (a mixture of acetonitrile - methanol - water with perchloric acid in a ratio of 40:40:20, pH 2.5) in a mixture with solution A (an aqueous solution of perchloric acid, pH 1.8) increased from 0% to 100% during 80 minutes at 30°C. Caffeic acid (traces) and rosmarinic acid (up to 2.9%) were found [33].

These plants can serve as potential sources for the creation of new highly effective drugs. However, for this purpose it is necessary to have data on the dynamics of accumulation of hydroxycinnamic acids depending on the season, place of growth, terms and conditions of harvesting, storage of the plant. In the absence of such data, studies aimed at normalization of the amount of hydroxycinnamic acids in potential plant raw material with high content are required.

Keywords: plant raw material, Russian Federation, hydroxycinnamic acids, high performance liquid chromatography, HPLC.

For citation: Kompantseva E.V., Slivkin A.I. High performance liquid chromatography in the quantitative analysis of hydroxycinnamic acids in plants growing in the Russian Federation. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 255-268 (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11149>

Введение

В контроле качества лекарственных средств основными аналитическими методами в настоящее время являются хроматографические. Ведущее место, при этом, занимает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [1] А.И. Марахова в 2009 году и другие

авторы отмечали, что метод ВЭЖХ широко применяется в качественном и количественном анализе лекарственного растительного сырья (ЛРС). В частности, обращенно-фазовая ВЭЖХ является основным методом исследования флавоноидов и фенолокислот. К недостаткам метода можно отнести тщательную пробоподго-



товку для отделения производных фенольных соединений от других веществ, содержащихся в ЛРС, а также стадию концентрирования при их низком содержании в растении [2]. Несмотря на это, метод включен в ряд фармакопейных статей Государственной Фармакопеи РФ 14 издания для определения основных биологически активных соединений (БАС) в корнях и корневищах валерианы, элеутерококка и родиолы, в траве донника, в плодах и семенах лимонника [3].

Гидроксикоричные кислоты (ГКК) – один из видов биологически активных соединений, синтезируемых растениями. По химическому строению ГКК относятся к фенольным соединениям и являются представителями обширного класса фенилпропаноидов [4].

Изучение научных работ отечественных ученых, посвященных исследованию гидроксикоричных кислот в растениях, произрастающих или культивируемых на территории Российской Федерации (РФ) также свидетельствует о том, что хроматографические методы и, особенно, ВЭЖХ открывают широкие возможности в изучении этой области исследования.

Интерес к изучению гидроксикоричных кислот в растениях РФ не случаен. В настоящее время известно, что спектр фармакологической активности большинства гидроксикоричных кислот достаточно широк благодаря наличию фенольных гидроксиллов, проявляющих антиоксидантные свойства. Комбинация различных ГКК в лекарственных растениях обуславливает суммарный фармакологический эффект лекарственных препаратов на их основе. ГКК проявляют антигипоксическую, противовоспалительную, антимикробную, противогрибковую, активность, а также антиаритмическое, желчегонное, гепатопротекторное, антиаллергическое действие [4-6]. Возрастает интерес к феруловой [5], цикореовой [6], хлорогеновой и входящей в ее состав кофейной кислотам [7,8], а также к розмариновой кислоте [9].

В связи с вышеописанным, целью настоящего сообщения является обзор информации, представленной в отечественных научных журналах и материалах научных конференции, проводимых в РФ, касающийся использования метода ВЭЖХ для определения количественного содержания гидроксикоричных кислот в растениях, произрастающих или культивируемых на территории России.

Для исследования использованы источники отечественной научной литературы за период 2007-2022 г включительно, в которых приведены результаты применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения количественного содержания гидроксикоричных кислот в растительном сырье. Методом исследования служил системный контент-анализ источников литературы. Список литературы включает 50 источников.

Обсуждение результатов

Как следует из результатов изучения научных работ российских авторов ВЭЖХ анализ ГКК проводится, в основном, на аппаратуре и колонках зарубежных производителей. Крайне редко встречаются исследования, проведенные с помощью прибора Миллихром-А-02 [10-13]

Процесс элюирования производят как в градиентном режиме, так и в изократическом, при использовании подвижных фаз различных составов. Известно, что на конечный результат исследований, проводимых методом ВЭЖХ, влияет, в основном, правильный выбор режима элюирования и состав подвижных фаз. Из данных таблиц 1 и 2 следует, что подвижные фазы, используемые при ВЭЖХ-анализе фенольных соединений, обычно включают водные растворы уксусной, растворы уксусной, муравьиной или ортофосфорной кислот, а также метанол или ацетонитрил. При изократическом режиме элюирования в цитируемых работах чаще всего встречалась система

Таблица 1. Подвижные фазы изократического режима элюирования
 Table 1. Mobile phases of isocratic elution mode

Растение	Подвижная фаза	Ссылка*
<i>Lotus corniculatus L.</i>	4М лития перхлорат + 0.1М хлорная кислота : вода (5:95)	10
<i>Vaccinium oxycoccus L.</i> , <i>Vaccinium vitis-idaea L.</i> <i>Vaccinium myrtillus L.</i>	0.1% водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил, содержащий 0.1% муравьиной кислоты	14
<i>Echinacea purpurea (L.) Moench.</i>	ацетонитрил-вода-фосфорная кислота в диапазоне объемных соотношений от 10:90:0.5 до 12:88:0.5	1
<i>Thymus talijevii Klokov & Des.-Shost.</i>	Вода-ацетонитрил-фосфорная кислота (80:20:0.05)	15
Род <i>Berberis</i> **	8% ацетонитрила, 2% уксусной кислоты, 0.2% триэтиламина в воде	16
<i>Echinacea purpurea (L.) Moench.</i>	Ацетонитрил – 0.01 М раствор калия дигидрофосфата, доведенный фосфорной кислотой до pH 3.0±0.2 (15:85)	17
<i>Campánula latifolia L.</i>	Метанол – 2.3% уксусная кислота (30:70)	18
Род <i>Monarda</i> **	Метанол-вода-фосфорная кислота (400:600: 5)	19
<i>Grossularia reclinata (L.) Mill.</i>	Метанол-вода-фосфорная кислота (400:600: 5)	20
<i>Knautia arvensis (L.) Coult.) :</i>	Метанол-вода-фосфорная кислота (400:600: 5)	21
Род <i>Euphrasia</i> **	Метанол-вода-фосфорная кислота (400:600: 5)	22
<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	Метанол-вода-фосфорная кислота (20:80:0.5)	12

*источник литературы; **анализ нескольких видов растений данного рода

растворителей «метанол-вода-фосфорная кислота», а также сочетание ацетонитрила и воды с фосфорной, хлорной или уксусной кислотами. Большим разнообразием отличаются системы растворителей, используемых при градиентном режиме элюирования. Из 16, приведенных в качестве примеров опубликованных работ, в 8 работах одной из подвижных фаз является ацетонитрил или ацетонитрил в присутствии муравьиной или трифторуксусной кислот, а в трех работах – метанол. В 4 работах в качестве одной из подвижных фаз была использована смесь перхлората лития в растворе хлорной кислоты различных концентраций. Описана также подвижная фаза, в которой в 0.1% растворе фосфорной кислоты содержание метанола изменяется от 50 до 52% за 56 минут. Отмечается, что оптимальный баланс между качеством разделения и временем анализа может зависеть не только от правильного выбора

подвижных фаз, но и от качества используемой колонки, ее размера, а также от качества адсорбента и его зернения. Важным моментом в качественном разделении ГЖК при использовании градиентного режима элюирования является программа режима элюирования. В изученных нами работах авторы тщательно подходили к выбору программ, которые в каждой работе имели индивидуальный характер.

Так, в градиентном режиме элюирования определяли содержание гидроксикоричных кислот в *Prunella vulgaris L.*, *P. Laciniata (L.) L.* и *P. grandiflora (L.) Turra*. При этом, доля раствора В (смесь ацетонитрил - метанол - вода с хлорной кислотой в соотношении 40:40:20, pH 2.5) в смеси с раствором А (водный раствор хлорной кислоты, pH 1.8) возрастала от 0% до 100% в течение 80 минут, при температуре 30°C. Найдены кофейная кислота (следы) и розмариновая кислота (до 2.9%) [33].



Таблица 2. Подвижные фазы градиентного режима элюирования
Table 2. Mobile phases of the gradient elution mode

Растение	Подвижная фаза	Ссылка*
<i>Nepeta cataria</i> L.	А – 2.2 М LiClO ₄ в 2.228 М хлорной кислоте В – ацетонитрил	23
<i>Bupleurum multinerve</i> DC.	А – 0.2 М LiClO ₄ в 2.5 мкМ хлорной кислоте В – ацетонитрил	11
<i>Galeopsis bifida</i> L.	А – 0.2 М LiClO ₄ в 0.006 М хлорной кислоте В-ацетонитрил	24
<i>Parasenecio hastatus</i> (L.) H. Koyama	А – 4.1 М LiClO ₄ в 0.1 М хлорной кислоте и вода 5:95 В-ацетонитрил	25
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	А- 0.1% ортофосфорной кислоты, 0.3% тетрагидрофурана, 0.018% триэтиламина В – метанол	26
<i>Achillea millefolium</i> L. <i>Origanum vulgare</i>	А – 0.1 % ортофосфорной кислоты; 0.3 % тетрагидрофурана; 0.018 % триэтиламина В – метанол	27
<i>Prunella vulgaris</i> L.	А- 0.1% ортофосфорной кислоты, 0.3% тетрагидрофурана, 0.018% триэтиламина В- метанол	28
Род <i>Berberis</i> ** <i>Rosa canina</i> L.	А – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в воде В – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле	29
<i>Artemisia taurica</i> Willd. <i>Artemisia santonica</i>	А – ацетонитрил В – 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде	30
<i>Viburnum opulus</i> L.	А- 1% раствор муравьиной кислоты В - ацетонитрил	31
<i>Cichorium intybus</i> L.	А – ацетонитрил В – 0.1 % раствор фосфорной кислоты в воде	32
<i>Prunella vulgaris</i> L. и <i>Prunella laciniata</i> (L.) L.	А – водный раствор хлорной кислоты с pH 1.8 В – смесь ацетонитрил-метанол- вода- 40:40:20, pH 2.5	33
Род <i>Aronia</i> **	А – 10 % муравьиной кислоты и 6 % ацетонитрила в воде; В – 10 % муравьиной кислоты и 20 % ацетонитрила в воде.	34
<i>Achillea millefolium</i> L.	А – ацетонитрил; В – 0.04М калия дигидрофосфат, подкисленного фосфорной кислотой до pH 2.8	35
<i>Polygonum aviculare</i> L.	В 0.1% растворе фосфорной кислоты метанол изменяет концентрацию от 50 - 52% (56 мин)	36
Пряно-ароматические растения Никитского ботанического сада	А – 0.1% раствор трифторуксусной кислоты в воде; В – 0.1% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле	37

*источник литературы; ** анализ нескольких видов растений данного рода.

С помощью метода ВЭЖХ при градиентном режиме элюирования проведено также исследование ГКК травы *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Условия проведения анализа: хроматограф Waters Alliance 2695 с ДМД 2996; колонка Zorbax SB-C18 150 x 4.6 + 12.5 x 4.6 мм

3.5 мкМ ПФ В: вода – ацетонитрил – фосфорная кислота (900 : 100 : 4); ПФ D: вода – ацетонитрил – фосфорная кислота (150 : 850 : 4); расход ПФ 1 см³/мин; объем пробы 20 мкл; температура колонки – 30°C; длина волны детектирования – 320 нм. Установлено, что в извле-

чений из свежего сырья преобладает феруловая кислота, а в извлечении из сухого сырья в большей степени накапливаются цикориевая и хлорогеновая кислоты, которые, по-видимому, образуются в растении как вторичные метаболиты в процессе высушивания. Остальные гидроксикоричные кислоты присутствуют в следовых количествах [38]. Еще одно исследование посвящено выбору оптимального экстрагента ГКК травы *Echinacea purpurea* (L.) Moench., в котором авторы выбрали изократический режим элюирования: подвижная фаза - смесь ацетонитрила и 0.01 М раствора калия дигидрофосфата, доведенного кислотой фосфорной до pH 3.0, в объемном соотношении 15:85. Показано, что максимальная концентрация суммы ГКК наблюдалась в извлечениях, полученных при экстракции 60% метанолом, 40% этанолом, 40% пропанолом-1, 60% ацетоном и 20% ДМСО и наиболее воспроизводимые результаты получены при экстракции 60% ацетоном [17].

В таблице 3 приведены результаты определения ГКК методом ВЭЖХ в 22 видах сырья растений, относящихся к различным семействам. Сырьем для исследования служила, в основном, надземная часть растений (трава, листья и цветки), свежие листья (*Cynara cardunculus* L.) и свежие плоды (*Viburnum opulus* L.) [31, 39], а также в некоторых случаях сухие плоды [29] и корни *Arctium tomentosum* Mill. [13]. Для использования метода ВЭЖХ почти все извлечения из растений готовились в соотношении сырье/экстрагент от 1:3 до 1:20 и только в случае *Viburnum opulus* L. было использовано извлечение 1:40 [31]. В качестве экстрагента, как показал анализ работ (таблица 3), предложены вода [31,39] и этиловый спирт различной концентрации (40, 50, 70 и 95%). Экстракцию ГКК проводили на кипящей водяной бане в течение 30 или 60 минут. Описан также прием настаивания при комнатной температуре в течение нескольких суток [26,41,42].

При экстракции ГКК *Galeopsis bifida* Boenn. и *Viburnum opulus* L. авторы использовали нагревание в ультразвуковой ванне [24, 31].

Свыше 1% ГКК было обнаружено в свежих листьях *Cynara cardunculus* L. [39], в траве *Prunella vulgaris* L. и *Prunella laciniata* (L.) L., листьях и корнях *Arctium tomentosum* Mill., траве *Galeopsis bifida* Boenn, листьях двух видов *Mentha* и плодах трех видов *Berberis* [13,24,29,33,41,42]. Причем в этих плодах найдено от 5 до 12% хлорогеновой кислоты. Как правило, значительные количества ГКК относились к хлорогеновой и розмариновой кислотам. В 11 исследованных растениях были обнаружены ГКК, содержание которых находилось в пределах десятых долей процента (хлорогеновая, розмариновая, редко кумаровая, феруловая и кофейная кислоты). Кроме того, такие ГКК как кофейная, кумаровая, феруловая и синаповая кислоты находились в исследуемых растениях в пределах сотых долей процента (табл.3).

Менее 0.1% найдено ГКК в таких растениях, как *Polygonum persicaria* L. [46], *Campánula latifolia* L. [18], *Grossularia reclinata* (L.) Mill. [20], *Melissa officinalis* L. [48], *Thymus talijevii* Klovov & Des.-Shost. [15], *Cichorium intybus* L. [32].

Представляет интерес исследование травы *Nepeta cataria* L., из которой были выделены 7 фенилпропаноидов (или ГКК) и установлено строение на основании данных УФ-, ИК-, МС-, ЯМР-спектроскопии. Количественный анализ растительного сырья проводили методом МК-ВЭЖХ-УФ (табл. 4).

Проведенные исследования показали, что растение способно накапливать существенные количества розмариновой и кофеилтартроновой кислоты [23]. В водном экстракте *Achillea millefolium* L. с помощью метода ВЭЖХ-УФ была определена концентрация кофеилхинных кислот. Установлено, что в аптечных образцах *Achillea millefolium* L. содержится 0.72 мг/дм³ транс-кофейной кислоты,

Таблица 3. Содержание гидроксикоричных кислот в растительном сырье (%)
 Table 3. The content of hydroxycinnamic acids in plant raw material (%)

Растение	Сырье	Кислоты					Литература
		коричная	кофейная	розмариновая	феруловая	хлорогеновая	
<i>Cynara cardunculus L.</i>	листья					1.50	39
<i>Berberis regeliana Kochne</i>	плоды		0.11		0.04	7.30	29
<i>Berberis vulgaris f. atropurpurea Regel</i>	плоды		0.09		0.36	12.1	29
<i>Berberis thunbergii DC.</i>	плоды		0.05		0.03	5.1	29
<i>Hyssopus officinalis L.</i>	трава		0.01	0.17			26
<i>Viburnum opulus L.</i>	плоды					0.58	31
<i>Knautia arvensis (L.) J.M. Coult.</i>	трава		0.06		0.10*	0.65	21 40
<i>Lotus corniculatus L.</i>	трава		0.14				
<i>Arctium tomentosum Mill.</i>	листья		3.16			3.49	13
<i>Arctium tomentosum Mill.</i>	корни		0.57			2.71	13
<i>Monarda × hybrida hort.</i>	трава					0.13	19
<i>Mentha longifolia (L.) Huds)</i>	трава	0.02		1.51		0.09	41
<i>Mentha spicata L.</i>	листья		0.02	1.31		0.09*	42
<i>Galeopsis bifida Boenn)</i>	трава		0.05			2.21	24
<i>Leonurus quinquelobatus Gilib.</i>	трава					0.32	43
<i>Leonurus cardiaca L.</i>	трава					0.09	43
<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	листья побеги			0.18 0.06			12
<i>Spiraea baldshuanica B. Fedtsch</i>	листья цветки	0.30 0.37				0.51 0.66	44
<i>Morus nigra L.</i>	листья					0.14	20 45
<i>Rosa canina L.</i>	плоды		0.01			0.19	29
<i>Prunella grandiflora (L.) Turra</i>	трава		0.02	2.91			33
<i>Prunella laciniata (L.) L.</i>	трава		0.01	1.21			33

*или изомеры кислоты

1.90 мг/дм³ 4-О-кофеилхинной, 7.1 мг/дм³ 3-О-кофеилхинной, 5.1 мг/дм³ 5-О-кофеилхинной, 7.0 мг/дм³ 3,4-О-дикофеилхинной, 9.3 мг/дм³ 3,5-О-дикофеилхинной и 10.7 мг/дм³ 4,5-О-дикофеилхинной кислот. [35].

При исследовании состава фенольных соединений водно-спиртовых экстрактов свежих ягод *Vaccinium oxycoccus L.*, *Vaccinium vitis-idaea L.* и *Vaccinium myrtillus L.* методом ВЭЖХ (табл. 5), установлено

повышение их концентрации в ряду: клюква – брусника – черника [14].

Ю.Г. Базарнова и О.Б. Иванченко использовали метод ВЭЖХ для проведения исследований состава и свойств БАС водно-спиртовых экстрактов травы дикорастущих растений, разрешенных к применению в пищевой промышленности, для обогащения пищевых продуктов фитомикронутриентами [27]. Для идентификации фенольных веществ в полученных экстрактах авторы использовали

Таблица 4. Содержание гидроксикоричных кислот в сырье *Nepeta cataria* L. (мг/г) [23]
 Table 4. The content of hydroxycinnamic acids in *Nepeta cataria* L. raw material (mg/g)

ГКК	Цветки	Стебли	Корни	Листья
Кофейная кислота	0.45	0.98	1.84	0.68
Кофеилтартроновая кислота	4.23	16.70	3.85	20.10
Кафтаровая кислота	0.38	1.05	0.15	1.67
Цикориевая кислота	0.12	0.05	<0.01	0.14
Фазеловая кислота	0.42	1.12	<0.01	1.62
Розмариновая кислота	7.67	9.39	36.9	0.70
3-О-кофеилхинная кислота	0.15	0.39	0.22	0.59

Таблица 5. Содержание гидроксикоричных кислот в экстрактах, мг/дм³ [14]
 Table 5. The content of hydroxycinnamic acids in extracts, mg/dm³

ГКК	<i>Vaccinium oxycoccus</i> L.	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.
3-п-кумароилхинная	30	–	130
Хлорогеновая	532	240	342
Кофейная	4.3	13.6	4.7
Кумаровая	3.7	119	10
Феруловая	3.9	24	–

Таблица 6. Содержание гидроксикоричных кислот в экстрактах, мг/г [27]
 Table 6. Content of hydroxycinnamic acids in extracts, mg/g

ГКК	Экстракт			
	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Hypercium perforatum</i> L.	<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Origanum vulgare</i> L.
Хлорогеновая	0.72±0.04	–	3.12±0.16	0.16±0.01
Феруловая	0.76±0.04	1.44±0.07	0.76±0.04	0.16±0.01

стандартные образцы хлорогеновой и феруловой кислот (таблица 6).

Научными сотрудниками Никитского ботанического сада проводятся исследование состава биологически активных веществ перспективных видов, сортов и форм пряно-ароматических и лекарственных растений, произрастающих или выращенных на коллекционных участках в условиях Южного берега Крыма. Так в работах А.Е. Палий с соавт. в результате скрининговых исследований было определено содержание фенольных соединений в 32 видах пряно-ароматических и лекарственных растений из семейств *Lamiaceae*, *Asteraceae* и *Apiaceae*. [37,47]. Экстракцию суммы ГКК проводили 50% спиртом этиловым при соотношении сырья и экстрагента – 1:10, настаиванием в течение 10 суток при комнатной температуре. Из гидроксикоричных кислот во всех исследованных видах обнаружены

кофейная, хлорогеновая кислота и ее изомеры, в некоторых растениях – изомеры розмариновой кислоты [37]. Наличие розмариновой кислоты выявлено в 15 видах растений из семейств *Lamiaceae* и *Asteraceae*. В экстрактах растений семейства *Apiaceae* розмариновой кислоты не обнаружено [47]. Концентрация розмариновой кислоты в исследуемых видах составляла 40.6-2535.5 мг/100 г растительного сырья. Наиболее высокие концентрации обнаружены в семействе *Lamiaceae*: *Majorana hortensis*, *Mentha longifolia*, *Thymus vulgaris* и *Origanum vulgare* [37, 47]. Среди представителей семейства *Asteraceae* розмариновая кислота выявлена в четырех из семи видов рода *Artemisia* L., с максимальным содержанием в экстракте *Artemisia santonica* (756.0 мг/100 г) [47]. Розмариновая кислота оказалась в доминирующих количе-



ствах также в *Artemisia annu*. Самое высокое содержание суммы ГКК (до 2.7%) обнаружено в *Echinacea angustifolia* и *Echinacea purpurea* [37]. Среди основных кислот в сырье исследуемых растений оказались хлорогеновая и 4-кофеилхинная кислоты.

О.В. Старцевой с соавт. проведены исследования возможности определения ГКК методом ВЭЖХ на примере дикорастущих полыней Крыма – *Artemisia santonica* L. и *Artemisia taurica* Willd. Показана необходимость проводить пробоподготовку и анализ растения в день сбора, так как за время хранения данные по содержанию изучаемых веществ могут быть искажены. [30].

В качестве примера использования корректирующих коэффициентов, которые характеризуют зависимость площадей пиков и концентраций веществ, можно привести работу Д. В. Моисеева по определению ГКК в траве *Melissa officinalis* L. [48]. В работе были использованы градуировочные графики для розмариновой ($y = -1.996 + 1.016x$, $r = 0.9981$) и кофейной кислот ($y = -0.7159 + 0.9414x$, $r = 0.9988$) при длине волны детекции 280 нм [49]. Пренебрегая значением свободного члена линейной зависимости, можно получить отношение наклонов градуировочных графиков для розмариновой и кофейной кислот – $1.016/0.9414 = 1.079$. Определение содержания кофейной кислоты в образце проводили в пересчете на стандартный образец (0.04%). Содержание розмариновой кислоты, рассчитанное с использованием коэффициентов пересчета по кофейной кислоте [49], составляет 0.52%. содержание хлорогеновой кислоты находилось на уровне менее 0.01% [48].

Медведевым Ю.В. с соавт. [50] разработана методика определения гидроксикоричных кислот для экспертизы более 90 образцов сырья для БАД к пище, которая включена в «Руководство по методам контроля качества и безопасности биоло-

гически-активных добавок к пище». Изучены физико-химические свойства ГКК (растворимость, хроматографическая подвижность, УФ- и видимые спектры, масс-спектры). Подобраны оптимальные и доступные растворители для извлечения гидроксикоричных кислот (60 % раствор метанола) и определено оптимальное время экстрагирования (15 минут на кипящей водяной бане и обработка ультразвуком в течение 10 мин). Соотношение сырье/экстрагент 1:50 [50]. Результаты количественного содержания суммы ГКК в исследуемых образцах лекарственных растений и растительного сырья, используемого для получения БАД к пище, свидетельствуют о том, что наибольшее содержание ГКК обнаружено в листьях *Ilex paraguariensis* - 14.2%, в зеленых семенах *Coffea arabica* - 6.3% и в листьях *Tussilago farfara* – 5.3%. В 14 объектах исследования найдено гидроксикоричных кислот от 1.0 до 2.6%, еще в 23 объектах исследования – от 0.11 до 0.96%. В работе были использованы различные виды сырья: трава, листья, цветки, плоды, побеги, семена и почки. Из подземной части растений использовались корни, корневище и корневище с корнями. Чаще всего, в качестве объектов исследования использовалась трава.

Проведенный анализ изученной нами литературы свидетельствуют, что наиболее часто в растениях встречается хлорогеновая кислота. В статье В.И. Дейнека с соавт., отмечается, что хлорогеновая кислота является одной из важных составляющих фенилпропаноидной цепи метаболизма растений [16]. Авторами была разработана методика разделения изомеров хлорогеновой кислоты методом изократической обращенно-фазовой ВЭЖХ. Определено строение и содержание хлорогеновой (5-кофеилхинной) кислоты в плодах и листьях некоторых растений семейства *Berberidaceae*. Экстракты плодов и свежих листьев барбарисов Ботанического сада БелГУ получали настаиванием

Таблица 7. Хлорогеновые кислоты (QCA) плодов видов рода *Aronia* [34]

Table 7. Chlorogenic acids (QCA) of fruits of species of the genus *Aronia*

Вид аронии	Доля изомеров в смеси, моль %			Сумма * мг/100 г
	3QCA	5CQA	4CQA	
<i>Aronia melanocarpa</i>	71.9	13.3	14.7	0.341
<i>Aronia prunifolia</i>	37.7	59.1	3.1	0.157
<i>Aronia mitchurinii</i>	52.3	45.2	2.6	0.177
Плоды**	48.3	49.2	3.4	н/о
	39.4	58.2	2.4	н/о
	39.3	58.0	2.7	н/о
	43.3	53.8	3.0	н/о

*в пересчете на цианидин-3-глюкозид хлорид; **с деревьев на личном подворье; н/о – не определяли.

в элюенте в течение 3-6 часов. Установлено, что содержание хлорогеновой кислоты в некоторых видах достигает от 4 до 7%, что может указывать на высокую антиоксидантную активность плодов и листьев растений и препаратов на их основе.

В работе В.И. Дейнека с соавт. по изучению рябины исследованы плоды нескольких видов растений рода *Aronia* на содержание хлорогеновых кислот с целью определения химических маркеров для дифференциации этих видов (табл. 7). Авторы считают, что при выборе условий для определения хлорогеновых кислот следует контролировать разделяющую способность используемой хроматографической системы относительно изомерных хлорогеновых кислот [34].

Для идентификации ГКК надземных органов *Vupleurum multinerve* DC В.М. Мирович с соавт. использовали метод УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС в сравнении со стандартными образцами. В траве идентифицировано 7 фенилпропаноидов – эфиров хинной кислоты с кофейной, феруловой, кумаровой кислотами. Методом МК-ВЭЖХ-УФ в воздушно-сухом сырье надземных органах установлено их количественное содержание (мг/г): 5-О-Кофеилхинная – 6.60; 3-О-Кофеилхинная – 0.28; 3,5-Ди-О-кофеилхинная – 1.58; 4,5-Ди-О-кофеилхинная – 0.26; 5-О-Ферулоилхинная – 0.21; 3-О-Ферулоилхинная – 0.25; 5-О-п-Кумароилхинная – 0.55 [11].

В результате хроматографического разделения бутанольной фракции извлечения из листьев *Parasenecio hastatus* (L.) Н. Коуама было выделено и идентифицировано 12 фенилпропаноидов. С применением метода микроколоночной ВЭЖХ установлено, что максимальное содержание фенилпропаноидов в листьях. наблюдается в фазу массового цветения (до 60.83 мг/г). Доминирующими компонентами суммы ГКК оказались 5-О-кофеилхинная кислота и 3,5-ди-О-кофеилхинная кислота [25].

Заключение

Проведенный анализ научных исследований, опубликованных в журналах и материалах конференций, проводимых в РФ, показал, что российские ученые в последние 15 лет широко используют метод ВЭЖХ для определения количественного содержания ГКК в растениях, произрастающих или культивируемых на территории России, а также используемых для изготовления биологически активных добавок к пище. При этом следует отметить, что почти все работы проведены на зарубежном оборудовании. Для анализа успешно используются подвижные фазы растворителей как для изократического, так и градиентного режима элюирования. В 50 публикациях приведены результаты определения ГКК в растительном сырье около 150 растений. В качестве сырья преимущественно использовалась трава



или листья растений и почти во всех источниках обнаружена хлорогеновая кислота. Наибольшее ее количество содержат плоды трех видов *Berberis* (от 5% до 12%), листья *Parasenecio hastatus* (L.) Н. Кояма (6%), листья *Nepeta cataria* L. (2%), трава *Galeopsis bifida* L. (2.2%), листья *Synara cardunculus* L. (1.5%). Кроме растений, содержащих хлорогеновую кислоту, представляют интерес растения, содержащие розмариновую кислоту -- *Prunella grandiflora* (L.) Turra (2.9%), *Prunella laciniata* (L.) L. (1.2%), *Mentha spicata* L. (1.3%), *Majorana hortensis*, (1.7%), *Origanum vulgare* (2.5 %) и кофейную кислоту – листья *Arctium tomentosum* Mill. (3.2%). Данные растения могут служить потенциальными источниками для созда-

Список литературы/References

1. Sychev K.S. Unifikacija uslovij kontrolja prirodnyh organicheskikh soedinenij v rezhime obrashhenno-fazovoj zhidkostnoj hromatografii. Chast' 1. Flavonoly, flavonol-glikozidy, katehiny, gidroksikorichnye kisloty. *Fundamental'nye i prikladnye problemy tehniki i tehnologii*. 2019; 1(291): 120-127. (In Russ.)

2. Marahova, A.I. Fiziko-himicheskij analiz fenol'nyh soedinenij lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ja. *Farmacija*. 2009; 3: 52-55. (In Russ.)

3. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii: IV tom. MZ RF. 14-e izd. M.: Medicina. 2018, 7019 p. – Rezhim dostupa: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> . (In Russ.)

4. Kurkin V.A. Fenilpropanoidy kak vazhnejshaja gruppy biologicheski aktivnyh soedinenij lekarstvennyh rastenij. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovani*. 2015; 12-7: 1338-1342. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=8148> (data obrashhenija: 21.05.2022). (In Russ.)

5. Mathew S., Abraham T.E. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2000; 24(2/3): 59-83.

ния новых высокоэффективных лекарственных средств. Однако с этой целью необходимо иметь данные о динамике накопления ГКК в зависимости от времени года, места произрастания растения и стабильности от сроков хранения сырья. В опубликованных и подвергшихся анализу исследованиях нет результатов по возможности нормирования содержания ГКК в потенциальном сырье, обладающем их высоким содержанием.

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.

6. Sajbel' O.L., Baslinov S.L., Dargaeva T.D. Nakoplenie cikorievoj kisloty v nadzemnoj chasti dikorastushhego cikorija obyknovennogo (*Cichorium intybus* L.). «*Perspektivy lekarstvennogo rastenievodeniya*», *sbornik trudov mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii M. VILAR*, 2018; 533-539. (In Russ.)

7. Chuklin R.E., Maslikova G.V. Klinicheskaja farmakologija kofejnoj kisloty. *Mezhdunarodnyj zhurnal jeksperimental'nogo obrazovanija*. 2016; 12-3: 436-437. Rezhim dostupa: URL: <https://expeducation.ru/ru/article/view?id=11018> (data obrashhenija: 08.06.2022). (In Russ.)

8. Azarova O.V., Brjuhanov V.M., Zverev Ja.F. Farmakologicheskaja aktivnost' rozmarinovej kisloty. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*. 2010; 6: 28-33. (In Russ.)

9. Dejneka V.I., Olejnic E.Ju., Dejneka L.A. Hromatograficheskoe povedenie monokofeoilhinnyh i dikofeoilhinnyh kislot v uslovijah OF VJeZhH:zavisimost' ot stroeniya. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2021; 21(4): 458-465. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3628> (In Russ.)

10. Shplis O.N., Kolomic N.Je., Abramec N.Ju., Karakchieva N.I., Bondarchuk R.A., Zhalnina L.V. Fenol'nye soedinenija ljadvenca rogatogo kul'tiviruemogo v Zapadnoj Sibiri.



«Rol' metabolomiki v sovershenstvovanii biotekhnologicheskikh sredstv proizvodstva», sbornik trudov II mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii. M. 2019. 228-232. (In Russ.)

11. Mirovich V.M., Olennikov D.N., Petuhova S.A., Posohina A.A. Flavonoidy i fenilpropanoidy nadzemnyh organov volodushki mnogozhil'kovoju (Bupleurum multinerve DC.) flory Pribajkal'ja. *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2020; 4: 121-128. (In Russ.)

12. Tohsirova Z.M., Popov I.V., Popova O.I. Issledovanie fenol'nyh soedinenij list'ev i pobegov rozmarina lekarstvennogo (*Rosmarinus officinalis* L.), introducirovannogo v botanicheskom sadu Pjatigorskogo mediko-farmaceuticheskogo instituta. *Himija rastitel'nogo syr'ja*, 2018; 3; 199-207. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033733> (In Russ.)

13. Velichko V.V., Hanina M.A., Rodin A.P. Rezul'taty farmakognosticheskogo issledovanija list'ev i kornej lopuha vojlochnogo. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo gumanitarnogo instituta. Serija: mediko-biologicheskie nauki*. 2014; 1(1): 16-20. (In Russ.)

14. Belova E.A., Tritjek V.S., Shul'gau Z.T., Guljaev A.E., Kovalenko L.V., Drenin A.A., Botirov Je.H. Fenol'nye soedinenija jagod treh vidov rastenij roda *Vaccinium* L. «Fenol'nye soedinenija: svoystva, aktivnost', innovacii», sbornik nauchnyh statej po materialam X Mezhdunarodnogo simpoziuma «Fenol'nye soedinenija: fundamental'nye i prikladnye aspekty». Moskva, 14-19 maja 2018, 227-235. (In Russ.)

15. Alekseeva L.I., Teterjuk L.V. Fenol'nye soedinenija *Thymus talijevii* Klok. Et Schost. *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2008; 4: 65-68. (In Russ.)

16. Dejneka V.I., Hlebnikov V.A., Sorokopudov V.N., Anisimovich I.P. Hlorogenovaja kislota plodov i list'ev nekotoryh rastenij semejstva Berberidaceae. *Himija rastitel'nogo syr'ja*, 2008; 1: 57-61. (In Russ.)

17. Lukashov R.I. Vlijanie prirody i obsemnoj doli rastvoritelej na jekstrakciju gidroksikorichnyh kislot iz travy jehinacei purpurnoj. «Sovremennye problemy farmakognozii», sbornik materialov III Mezhvuzovskoj nauchno-prakticheskoj konferencii s

mezhdunarodnym uchastiem, posvjashhennoj 100-letiju Samarskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. 27 oktjabrja 2018. Samara, 84-89. (In Russ.)

18. Bubenchikova V.N., Nikitin E.A., Kulik O.N. Izuchenie fenol'nyh soedinenij travy kolokol'chika kruglolistnogo (*Campanula rotundifolia*) metodom VJeZhH-MSD. «Fenol'nye soedinenija: svoystva, aktivnost', innovacii», sbornik nauchnyh statej po materialam X Mezhdunarodnogo simpoziuma «Fenol'nye soedinenija: fundamental'nye i prikladnye aspekty», Moskva, 14-19 maja 2018; 246-253. (In Russ.)

19. Krasjuk E.V., Pupykina K.A., Anishhenko I.E. Harakteristika fenol'nyh soedinenij vidov monardy, introducirovannyh v Respublike Bashkortostan. *Bashkirskij himicheskij zhurnal*; 2015; 22(3): 79-83. (In Russ.)

20. Pelivanova S.L., Selina I.I., Andreeva O.A., Ogenesjan Je.T. Polifenol'nyj sostav list'ev kryzhovnika otklonennogo i shelkovicy chernoju. *Nauchnye vedomosti. Serija Medicina. Farmacija*. 2012; 22(20/1): 170-173. (In Russ.)

21. Kopyt'ko Ja.F., Dargaeva T.D. Issledovanie sostava fenol'nyh veshhestv travy *Knautia arvensis* metodom VJeZhH. «Fenol'nye soedinenija: svoystva, aktivnost', innovacii», sbornik nauchnyh statej po materialam X Mezhdunarodnogo simpoziuma «Fenol'nye soedinenija: fundamental'nye i prikladnye aspekty», Moskva, 14-19 maja 2018, 303-306. (In Russ.)

22. Bombello T.V., Petrichenko V.V., Krotkova V.A. Fenol'nye soedinenija nekotoryh vidov roda ochanka (*Euphrasia* L.) flory Permskogo kraja. *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2011; 4: 177-180. (In Russ.)

23. Kashhenko N.I., Olennikov D.N. Himicheskij profil' i biologicheskaja aktivnost' flavonoidov i fenilpropanoidov *Nepeta cataria* L. (*Lamiaceae*), introducirovannogo v Vostochnoj Sibiri, *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2011; 2: 25-32. (In Russ.)

24. Chirikova N.K., Olennikov D.N. Hemoraznoobrazie i biologicheskaja aktivnost' sinantropnyh rastenij Sibiri. I. *Galeopsis bifida* BOENN. (*Lamiaceae*). *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2016; 2: 33-46. (In Russ.)



25. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Cyrenzhapov A.V. Fenilpropanoidy *Parasenecio hastatus* (Compositae) i ih ranozazhivljajushhaja aktivnost'. *Himija rastitel'nogo syr'ja*, 2020; 1: 97-105. <https://doi.org/10.14258/jcpim.2020015223> (In Russ.)
26. Grebennikova O.A., Palij A.E., Hlypenko L.A., Rabotjagov V.D. Biologicheski aktivnye veshhestva *Hyssopus officinalis* L. *Orbital'*. 2017; 1; 21-28. (In Russ.)
27. Bazarnova Ju.G., Ivanchenko O.B. Issledovanie sostava biologicheski aktivnyh veshhestv jekstraktov dikorastushhih rastenij. *Voprosy pitanija*. 2016; 85(5): 100-107. (In Russ.)
28. Plugatar' Ju.V., Shevchuk O.M., Logvinenko L.A., Lejba V.D., Palij I.N. Soderzhanie fenol'nyh soedinenij v nadzemnoj masse *Prunella vulgaris* L. po gradientu vysoty nad urovnem morja. *Bulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sad*. 2017; 125: 42-46. (In Russ.)
29. Kutakova N.A., Morozkova I.A., Vasil'eva N.N., Bashkina I.E., Aleksandrova Ju.V. Fenol'nye soedinenija plodov barbarisa i shipovnika. *Izvestija vysshih uchebnyh zavedenij. Lesnoj zhurnal*. 2019; 5 (371): 115-124. <https://doi.org/10.17238/issn0536-1036.2019.5.115> (In Russ.)
30. Starceva O.V., Palij I.N., Simagina N.O., Makaricheva A.A. Bystryj metod polukolichestvennogo opredelenija hlorogenovoj kisloty i ejo proizvodnyh v polyni. *Orbital'*. 2017; 1: 7-13. (In Russ.)
31. Perova I. B., Zhogova A.A., Cherkashin A. V., Jeller K.I., Ramenskaja G.V., Samylina I.A. Biologicheski aktivnye veshhestva plodov kaliny obyknovennoj. *Himikofarmaceuticheskij zhurnal*. 2014; 48(5): 32-39. (In Russ.)
32. Sajbel' O.L., Dargaeva T.D., Cicilin A.N., Dul V.N. Razrabotka metodiki kolichestvennogo analiza biologicheski aktivnyh veshhestv i ocenka dinamiki ih nakoplenija v zavisimosti ot fazy vegetacii cikorija obyknovenno (Cichorium intybus L.). *Voprosy biologicheskoi, medicinskoj i farmaceuticheskoi himii*. 2016; 6: 20-24. (In Russ.)
33. Shamilov A.A., Popova N.V., Ivashev M.N. Poisk istochnikov rozmarinovoj kisloty vo flore Severnogo Kavkaza. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*, 2014; 4, Rezhim dostupa: URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=14138> (data obrashhenija: 19.05.2020) (In Russ.)
34. Dejneka V.I., Tret'jakov M.Yu., Olejnic E.Yu., Pavlov A.A., Dejneka L.A., Blinova I.P., Manohina L.A. Opredelenie antocianov i hlorogenovyh kislot v plodah rastenij roda Aronija: Opyt hemosistematiki. *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2018; 2: 161-167. (In Russ.)
35. Vernikovskaja N.A., Temerdashev Z.A. Identifikacija i hromatograficheskoe opredelenie fenol'nyh soedinenij v tysjachelistnike obyknovennom *Analitika i kontrol'*. 2012; 16(2): 188-194. (In Russ.)
36. Petruk A.A., Vysochina G.I. Fenol'nye soedinenija *Rolygonum aviculare* L. (Polygonaceae) iz geograficheski otdalennyh populjacij. *Izvestija vuzov. Prikladnaja himija i biotekhnologij*. 2019; 9(1): 95-101. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-95-101> (In Russ.)
37. Palij A.E., Grebennikova O.A., Rabotjagov V.D., Palij I.N. Biologicheski aktivnye veshhestva prjano-aromaticeskikh i lekarstvennyh rastenij kollekcii Nikitskogo botanicheskogo sada. «*Biologija rastenij i sadovodstvo: teorija, innovacii*», *sbornik nauchnyh trudov GNBS*. 2014; 139: 107-115. (In Russ.)
38. Denisenko Yu.O., Andreeva I.N., Denisenko O.N., Fedorova E.P., Chelova L.V. Vlijanie sposoba poluchenija jekstrakcionnyh preparatov iz travy jehinacei purpurnoj na sostav gidroksikorichnyh kislot. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. 2011; 6. Rezhim dospupa: URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=5281> (data obrashhenija: 23.05.2021). (In Russ.)
39. Pankratova G.A., Almakaeva N.I., Semenova E.V., Mel'nikov O.M., Tihonova E.V. Soderzhanie gidroksikorichnyh kislot v list'jah razlichnyh sortov *Cynara cardunculus* L. «*Novye dostizhenija v himii i himicheskoi tehnologii rastitel'nogo syr'ja*», *sbornik nauchnyh trudov. Barnaul*, 24-28 aprilja 2017, 274-276. (In Russ.)
40. Kopyt'ko Ja.F., Dargaeva T.D., Rendjuk T.D. Sostav travy korostavnika polevogo (*Knautia arvensis* L.), *Himikofarmaceuticheskij zhurnal*. 2020; 54(7): 41-48.



<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2020-54-7-41-48> (In Russ.)

41. Grebennikova O.A., Palij A.E., Rabotjagov V.D. Fenol'nye soedinenija vodno-jetanol'nogo jekstrakta *Mentha longifolia L.* *Farmacija i farmakologija*. 2014; 2(6-7): 5-7. (In Russ.)

42. Grebennikova O.A., Palij A.E., Hrisotova Yu.P. Biologicheski aktivnye veshhestva *Mentha spicata L.* *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2014; 4: 203-208. (In Russ.)

43. Zhogova A.A., Perova I. B., Samylina I.A., Jeller K.I., Ramenskaja G.V. Identifikacija i kolichestvennoe opredelenie osnovnyh biologicheski aktivnyh veshhestv travy pustyrnika s pomoshh'ju VJeZhH-mass-spektrometrii. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*. 2014; 48(7): 35-40. (In Russ.)

44. Kostikova, V.A., Bobokalonov K.A., Kuznecov A.A. Fenol'nye soedinenija list'ev i socvetij *Spiraea baldshuanica B.* Fedtsch. *Izvestija vuzov. Prikladnaja himija i biotehnologija*. 2021; 1(36): 53-60. (In Russ.)

45. Selina I.I., Andreeva O.A., Oganessian Je.T. Izuchenie polifenol'nogo sostava list'ev shelkovicy chjornoj (*Morus nigra L.*). «*Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmaceuticheskoy produkcii*», *sbornik nauchnyh*

trudov.Pjatigorsk. 2013; 68: 101-102. (In Russ.)

46. Perova I.B., Jeller K.I., Mal'ceva A.A., Chistjakova A.S., Slivkin A.I., Sorokina A.A. Gidroksikorichnye kisloty travy gorca pochechujnogo. *Farmacij*. 2017; 66(5): 27-31. (In Russ.)

47. Palij A.E., Melikov F.M., Grebennikova O.A., Rabotjagov V.D. Rozmarinovaja kislota i ee syr'evye istochniki v Krymu. *Farmacija i farmakologija*. 2015; 9(2): 7-12. (In Russ.)

48. Moiseev D.V., Stojakova I.I. Opredelenie fenol'nyh kislot v trave melissy lekarstvennoj metodom VJeZhH. «*Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmaceuticheskoy produkcii*», *sbornik nauchnyh trudov. Izhevsk*. 2019; 74: 32-33. (In Russ.)

49. Caniova A., Brandsteterova E. HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*. 2001; 24(17): 2647-2659.

50. Medvedev Ju.V., Perederjaev O.I., Arzamascev A.P., Jeller K.I., Prokof'eva V.I. Opredelenie gidroksikorichnyh kislot v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i ob#ektah rastitel'nogo proishozhdenija. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii*. 2010; 3: 25-31. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Е.В. Компанцева – д.фарм.н., профессор, профессор кафедры фармацевтической химии ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО «ВолГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия

А.И. Сливкин – д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

E.V. Kompantseva – Ph.D (pharmacy), professor, professor of the department of pharmaceutical chemistry PMFI - branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russian Federation, E-mail: dskompanceva@mail.ru
A.I. Slivkin – Ph.D (pharmacy), professor, manager chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: slivkin@pharmvsu.ru

Статья поступила в редакцию 22.11.2023; одобрена после рецензирования 04.02.2023; принята к публикации 15.02.2023.

The article was submitted 22.11.2023; approved after reviewing 04.02.2023; accepted for publication 15.02.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544:547.784:547.784

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11150

Применение методов ТСХ и ВЭЖХ/МС для оптимизации условий синтеза 10-аминобензо[4,5]имидазо[1,2-а]пиримидинов

Дмитрий Юрьевич Вандышев¹✉, Татьяна Николаевна Хмелевская²,
Владислав Юрьевич Газин¹, Хидмет Сафарович Шихалиев¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, francy_2007@mail.ru✉

²Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

Аннотация. Современный рациональный дизайн полифункциональных (по сферам практического назначения) гетероциклических 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 полиазо-гетероциклических структур, в том числе содержащих имидазольный фрагмент. Поэтому, актуальными являются проблемы, связанные с поиском новых селективных синтетических подходов к построению гетероциклических систем на основе имидазола, изучением с помощью хроматографических методов механизмов их образования, реакционной способности и дальнейшей направленной функционализации, выбора доступных реагентов для их синтеза.

В этом отношении перспективны 1,2-диаминоимидазолы, интерес к которым обусловлен их двойственной реакционной способностью. Наличие в данной молекуле четырех (1,2-диамино-4-R-имидазол) или трех (1,2-диаминобензимидазол, 1,2-диамино-4-R-5-R1-имидазол) неэквивалентных нуклеофильных центров обеспечивает альтернативные возможности в направлении реакций с диэлектрофилами что, за счет подбора определенных условий и катализаторов, открывает широкие возможности получения новых пяти-, шести- и семичленных аннелированных и линейно связанных азотсодержащих гетероциклических соединений, перспективных в том числе для использования в качестве добавок в процессах электрохимического меднения [1-2].

В данной работе, нами предложен новый способ получения имидазо[1,2-а]пиримидинов, образующихся в ходе взаимодействия 1,2-диаминобензимидазола с диметилацетилендикарбоксилатом. При помощи ВЭЖХ-МС и тонкослойной хроматографии (ТСХ) изучены и подобраны оптимальные условия для проведения данной реакции.

Ключевые слова: 1,2-диаминобензимидазол, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, масс-спектрометрия, имидазо[1,2-а]пиримидины, оптимизация условий

Благодарности: результаты получены в рамках выполнения работ 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: Вандышев Д.Ю., Хмелевская Т.Н., Газин В.Ю., Шихалиев Х.С. Применение методов ТСХ и ВЭЖХ/МС для оптимизации условий синтеза 10-аминобензо[4,5]имидазо[1,2-а]пиримидинов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 2. С. 269-279. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11150>



Original article

Application of TLC and HPLC/MS methods for the optimize of the conditions for the synthesis of 10-aminobenzo[4,5]imidazo[1,2-A]pyrimidines

Dmitry Yu. Vandyshev¹✉, Tatiana N. Khmelevskaya²,
Vladislav Yu. Gazin¹, Khidmet S. Shikhaliev¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, francy_2007@mail.ru✉

² Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russian Federation

Abstract. The modern rational design of polyfunctional (according to practical use) heterocyclic compounds requires high efficiency due to the need simultaneously increase the molecular complexity and minimize the number of steps in synthetic procedures. These problems become even more important in the construction of various polyazaheterocyclic structures, including those containing an imidazole fragment. Therefore, the problems associated with the search for new selective synthetic approaches to the construction of heterocyclic systems based on imidazole, the study of the mechanisms of their formation, reactivity and further directed functionalization, the choice of available reagents for their synthesis using chromatographic methods are important. Therefore, 1,2-diaminoimidazoles with dual reactivity are promising compounds. The presence in this molecule of four (1,2-diamino-4-R-imidazole) or three (1,2-diaminobenzimidazole, 1,2-diamino-4-R-5-R1-imidazole) of non-equivalent nucleophilic centres provides alternative possibilities in the direction of reactions with dielectrophiles, which, due to the selection of certain conditions and catalysts, opens up wide possibilities for obtaining new five-, six-, and seven-membered annelated and linearly bonded nitrogen-containing heterocyclic compounds, which are also promising for use as additives in the processes of electrochemical copper plating [1-2].

In this study, we proposed a new method for obtaining imidazo[1,2-A]pyrimidines formed during the interaction of 1,2-diaminobenzimidazole with dimethylacetylenedicarboxylate. Using HPLC-MS and thin-layer chromatography (TLC), the optimal conditions for this reaction were studied and selected.

Keywords: 1,2-diaminobenzimidazole, high performance liquid chromatography, thin layer chromatography, mass spectrometry, imidazo[1,2-a]pyrimidines, optimization of conditions.

Acknowledgments: the study 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: Vandyshev D.Yu., Khmelevskaya T.N., Gazin V.Yu., Shikhaliev Kh.S. Application of TLC and HPLC/MS methods for the optimize of the conditions for the synthesis of 10-aminobenzo[4,5]imidazo[1,2-A]pyrimidines. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 269-279 (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11150>

Введение

В последние годы было синтезировано значительное количество новых производных имидазопиримидинов, обладающих различной фармакологической активностью, а также применимых в качестве различных добавок в процессах, применяемых в микроэлектронике [1-2]. Интерес к построению данной матрицы прежде всего обусловлен структурным сходством с природными биологически активными веществами, в частности с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Среди образующихся соединений

обнаружены ингибиторы фосфодиэстеразы, топоизомеразы, р38 MAP-киназы, антагонисты эстрогенположительных рецепторов и CRF рецепторов 1, 2 α и 2 β типов [3-9]. В связи с этим они используются в качестве противовоспалительных, успокоительных, сосудорасширяющих, антибактериальных, противогрибковых, противовирусных, противоопухолевых лекарственных средств [10-12]. Из возможных вариантов сочленения бензимидазольного и пиримидинового циклов наиболее распространенными являются пиримидо[1,2-а]бензимидазолы, которые можно синтезировать различными методами [10].



Одним из способов синтеза пиримидо[1,2-а]бензимидазолов является гетероциклизация пиримидинов с аминокспиртами [3] или 2-аминопиримидинов с бромкетонами [6-7]. Однако это направление, как правило, включает большое количество стадий, в том числе с использованием труднодоступных реагентов. Поэтому синтетически более привлекательным представляется построение бензимидазопиримидиновой системы из производных бензимидазола, в частности из 2-аминобензимидазола [13-16] и 1,2-диаминобензимидазола.

Полинуклеофильность 1,2-диаминобензимидазола обуславливает различные варианты взаимодействия с диэлектрофильными реагентами. Для создания пиримидинового цикла 1,2-диаминобензимидазол должен взаимодействовать с 1,3-диэлектрофилами как 1,3-N-C-N-динуклеофил. Известна двухкомпонентная реакция данного диамина с этоксиметиленовыми производными диэтилмалоната и циануксусного эфира [17], а также с N-арилмалеимидами [18] и N-арилитаконидами [19]. При взаимодействии с хлорангидридами карбоновых кислот [20], карбоновыми кислотами [21], их сложными эфирами и 1,3-дикарбонильными соединениями [22] 1,2-диаминобензимидазол реагирует как 1,4-N-N-C-N-динуклеофил, что приводит к образованию пяти- и шестичленных систем.

На основании всего вышеизложенного целью данной работы являлось изучение взаимодействия 1,2-диаминобензимидазола с диметилацетилендикарбоксилатом (ДМАД): подбор оптимальных условий данной реакции с использованием методов классического органического синтеза и аналитической химии. Стоит также отметить, что ДМАД – это универсальный синтетический инструмент для химиков-органиков, благодаря которому были открыты совершенно новые методы в комбинаторной химии и многокомпонентных реакциях получения гетероцикличе-

ских соединений. Являясь представителем электронодефицитных ацетиленовых производных, в зависимости от выбираемых условий, он может выступать в роли акцептора Михаэля или вступать в реакции циклоприсоединения. Особый интерес представляют взаимодействия ДМАД с аминоксидами, приводящие, в зависимости от условий, к образованию различных гетероциклических систем из структурно схожих исходных бинуклеофильных субстратов. Все эти различия могут быть связаны с эффектом растворителя, катализа, а также с природой заместителей [23-29].

Экспериментальная часть

Исходный 1,2-диаминобензимидазол синтезирован по ранее описанной методике [30], ДМАД и этилпропаргилат – приобретены в компании Alinda-Chemical Ltd (США-Россия).

Методика синтеза метил 10-амино-2-оксо-2,10-дигидробензо[4,5]имидазо[1,2-а]пиримидин-4-карбоксилата 5. К 5 ммоль диаминоимидазола 1, растворенного в 5 см³ метанола с добавлением каталитических количеств уксусной кислоты (2-3 капли), по каплям прибавляли 5 ммоль диметилового эфира ацетилендикарбоновой кислоты 2. После добавления 2, реакционную массу кипятили в колбе с обратным холодильником в течение 60 минут. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и перекристаллизовывали из метанола. Выход 93%, т.пл. 257-259°C. ¹H ЯМР спектр, δ, м.д.: 7.66 (1H, д, J=8.3, H_{бенз}); 7.55 (1H, д, J=7.4, H_{бенз}); 7.45 (1H, т, J=7.4, H_{бенз}); 7.26 (1H, тд, J=7.3, J=1.2, H_{бенз}); 6.56 (1H, с, СН_{пиримид}); 5.82 (2H, с, NH₂); 4.03 (3H, с, СН₃). Найдено, m/z: 259.0825 [M+H]⁺. C₁₂H₁₀N₄O₃. Вычислено, m/z: 259.0826 [M+H]⁺.

Методика синтеза 10-амино-2-оксо-2,10-дигидробензо[4,5]имидазо[1,2-а]пиримидин-4-карбоновой кислоты 6. К 5 ммоль соединения 5 добавляли 5.5 ммоль гидроксида калия, предварительно растворенного в 5 см³ воды. Смесь кипятили

в течение 2 часов, до полного исчезновения 5 (контроль по ТСХ). По охлаждению реакционной массы смесь подкисляли соляной кислотой до кислой реакции среды. Образующийся осадок отфильтровывали. Выход 78%, т.пл. 290-292°C. ^1H ЯМР спектр, δ , м.д.: 12.32 (1H, уш.с, OH); 7.62 (1H, д, $J = 8.2$, $\text{H}_{\text{бенз}}$); 7.53 (1H, д, $J=7.7$, $\text{H}_{\text{бенз}}$); 7.41 (1H, т, $J=8.0$, $\text{H}_{\text{бенз}}$); 7.34 (1H, тд, $J=7.3$, $J=1.2$, $\text{H}_{\text{бенз}}$); 6.51 (1H, с, $\text{CH}_{\text{пиримид}}$); 5.76 (2H, с, NH_2). Найдено, m/z : 245.0670 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_3$. Вычислено, m/z : 245.0669 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Методика синтеза 10-аминобензо[4,5]имидазо[1,2-*a*]пиримидин-2(10H)-она 7. Способ А: 5 ммоль кислоты 6 растворяли в 5 см³ дифенилового эфира и при постоянном нагревании и перемешивании прибавляли 15 ммоль ацетата меди (II). Реакционную массу оставляли кипеть в течение 3 часов. Образующийся осадок отфильтровывали, промывали водой, а затем перекристаллизовывали из смеси изопропиловый спирт – диметилформамид, 2:1. Способ Б: К 5 ммоль диаминоимидазола 1, предварительно растворенного в 5 см³ метанола с добавлением каталитических количеств уксусной кислоты (2-3 капли), при постоянном перемешивании и нагревании в пределах 40°C по каплям добавляли 5 ммоль этилпропиоата 8. После, реакционную массу выдерживали при этой температуре в течение 60 минут. Образующийся осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из смеси изопропиловый спирт – диметилформамид, 2:1. Выход 49% (А) и 83% (Б), т.пл. >300 °С. ^1H ЯМР спектр, δ , м.д.: 8.66 (1H, д, $J=7.5$, $\text{CH}_{\text{пиримид}}$); 7.91 (1H, д, $J=8.0$, $\text{H}_{\text{бенз}}$); 7.49 (1H, д, $J=7.9$, $\text{H}_{\text{бенз}}$); 7.41 (1H, т, $J=7.6$, $\text{H}_{\text{бенз}}$); 7.30 (1H, т, $J=7.5$, $\text{H}_{\text{бенз}}$); 6.15 (1H, д, $J=7.5$, $\text{CH}_{\text{пиримид}}$); 5.77 (2H, с, NH_2). Найдено, m/z : 201.0771 $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$. Вычислено, m/z : 201.0771 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Для проведения анализа методом ТСХ использовалась подвижная фаза (ПФ) в составе хлороформ-метанол (20:1), (10:1)

или метанол. Компоненты ПФ смешивались непосредственно перед анализом, время насыщения камеры составляло 10 минут. Пробоподготовка заключалась в растворении 400 мкг анализируемого образца в 0.5 см³ диметилформамида. Хроматографирование проводилось на пластинках для ТСХ TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) длиной 4 см. Объем пробы – 1 мкл. Время анализа 10 минут. Для проявления хроматографических зон пластину помещали в УФ камеру или обрабатывали парами йода. Все используемые реактивы имели степень чистоты не менее «хч».

^1H ЯМР и NOESY спектры были зарегистрированы на спектрометре BrukerDRX-500 (500.13 МГц) в DMSO-D₆ с внутренним стандартом TMS. ВЭЖХ/МС анализ проводился на приборе Agilent Technologies 1260 infinity с масс-детектором Agilent 6230 TOF LC/MS (времяпролетный детектор масс высокого разрешения), метод ионизации – двойное электрораспыление (dual-ESI). Запись и регистрация сигналов проводилась в положительной полярности; небулайзер (N_2) 20 psig, газ-осушитель (N_2) 6 см³/мин, 325°C; 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/вода (0.1% муравьиной кислоты); скорость потока 0.4 см³/мин. Программное обеспечение для обработки результатов исследований – MassHunter Workstation/Data Acquisition V.06.00. Температуры плавления определены на аппарате Stuart SMP30.

Обсуждение результатов

Учитывая, что процессы с участием диаминоазолов и ДМАД сильно зависят

Таблица 1. Содержание 1,2-диаминобензимидазола в реакционной массе
Table 1. The content of 1,2-diaminobenzimidazole in the reaction mass

Растворитель	Время реакции, мин		
	0	60	120
Бензол	100	80	63
1,4-Диоксан	100	50	35
Хлористый метилен	100	60	40.2
Хлороформ	100	70	54.5
Этанол	100	37.6	0.57
Метанол	100	14.6	0
Метанол/уксусная кислота (кат)	100	0.71	-
Метанол/уксусная кислота (1:1)	100	42.1	32.8

от природы растворителя, нами были изучены и подобраны оптимальные условия реакции между 1,2-диаминобензимидазолом 1 и ДМАД 2. На основании литературных данных и растворимости исходного диамина в качестве растворителей нами были выбраны бензол, диоксан, хлороформ, хлористый метилен, метанол и этанол. Оценка состава реакционной массы осуществлялась при помощи ТСХ и ВЭЖХ/МС анализа. Интерпретация сигналов произведена на основе предварительно рассчитанных масс, в виде молекулярных ионов с $[M+H]^+$, всех возможных исходных, промежуточных и образующихся веществ. Пробы отбирались в 0, 60 и 120 минут. Необходимо также отметить, что ДМАД в условиях нашего эксперимента ВЭЖХ/МС не протонировался и не детектировался при данной длине волны. Полученные результаты отражены в табл. 1.

Как видно из таблицы 1, при использовании таких растворителей как бензол, диоксан, хлороформ, хлористый метилен максимальная конверсия исходного диамина после двухчасового кипячения составляет около 37-45 %. При этом в реакционной массе фиксируются сигналы образующихся интермедиатов и продуктов их внутримолекулярной циклизации.

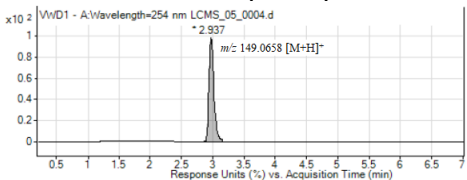
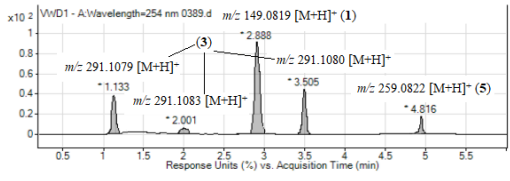
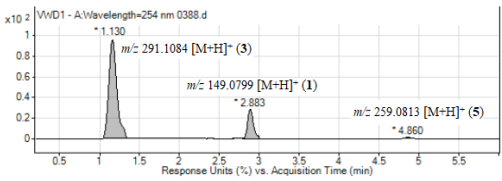
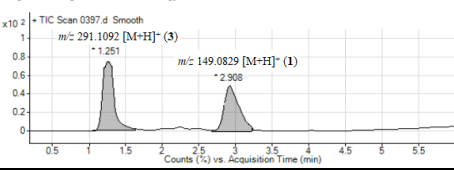
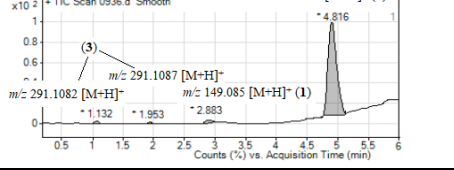
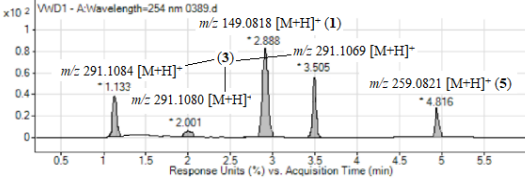
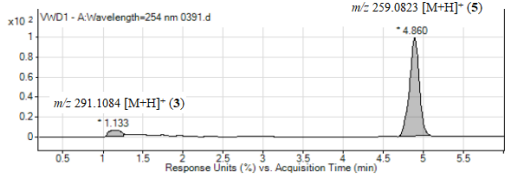
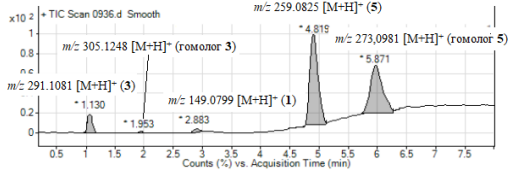
Иная картина наблюдается при использовании метанола и этанола. Полная конверсия 1 происходит за 2 часа. Однако, в случае применения этилового спирта, образование целевого продукта реакции было значительно ниже, что

можно объяснить протекающим процессом переэтерификации сложноэфирного фрагмента и образующаяся смесь этиловых и метиловых эфиров не поддавалась индивидуализации.

Ранее нами было установлено, что реакции гетероциклизаций с участием диаминоимидазола протекают с большей скоростью в присутствии кислотного катализа (уксусной кислоты) [18-19, 23]. Введение ее в изучаемый процесс к подобранному, оптимальному растворителю (метанол) в различных количествах, существенно изменяло картину взаимодействия. Как видно из таблицы 1, при добавлении каталитических количеств уксусной кислоты полная конверсия реагентов достигалась за 60 минут. При этом, следует отметить, что, несмотря на полную конверсию диамина уже через 60 минут, проведение реакции в чистой уксусной кислоте приводило к образованию многочисленных побочных продуктов с молекулярными массами, отличными от расчетных значений предполагаемого продукта. Интегрированные сканированные хроматограммы полного ионного тока для реакционных масс исследуемого процесса, на примере бензола, метанола, этанола и метанола с каталитическим количеством уксусной кислоты, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Примеры полученных хроматограмм.

Table 2. Examples of obtained chromatograms

t, мин	Интегрированные сканированные хроматограммы полного ионного тока
0	<p style="text-align: center;">Независимо от растворителя</p> 
60	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Бензол</p>  </div> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Метанол</p>  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Этанол</p>  </div> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Метанол с каталитическим количеством уксусной кислоты</p>  </div> </div>
120	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Бензол</p>  </div> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Метанол</p>  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Этанол</p>  </div> </div>

Таким образом, установлено, что наиболее гладко реакция между диметилацетилендикарбоксилатом 2 и 1,2-диаминобензимидазолом 1 протекает при использовании в качестве растворителя метанола с добавлением каталитических количеств уксусной кислоты. При этом полная конверсия исходного диаминна и мак-

симальный выход целевого продукта достигаются после часового кипячения реагентов.

Принимая во внимание полинуклеофильный характер исходного 1,2-диаминобензимидазола 1, на схеме 1 отражены структуры всех возможных полупродуктов его взаимодействия с ДМАД 2. Так, на первом этапе,

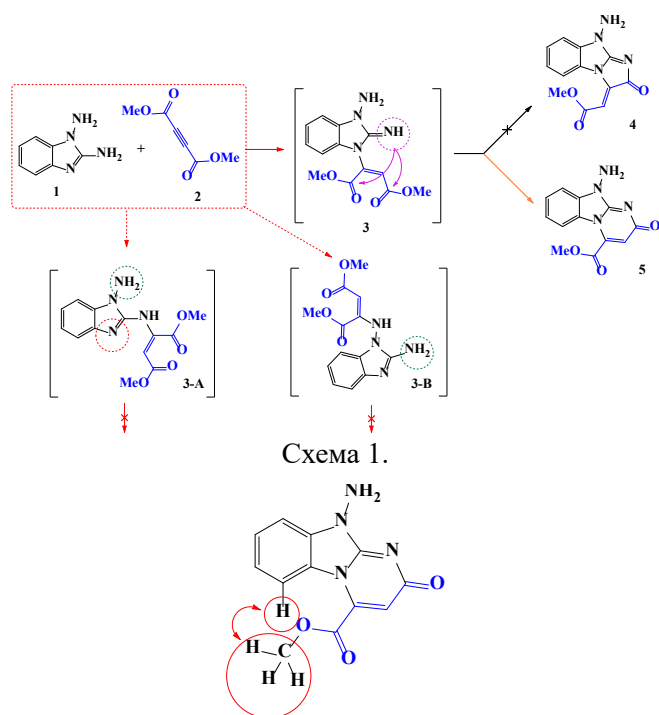


Рис. 1. Ключевые взаимодействия в спектрах NOESY соединения 5.
 Fig. 1. Key interactions in the NOESY spectra of the compound 5

присоединение 1 по тройной связи к 2 за счет NH-фрагмента цикла и NH₂ групп, может приводить к соответствующим интермедиатам 3, 3-A и 3-B. Образующиеся аддукты Михаэля могут подвергаться внутримолекулярной циклизации, за счет «ближайшей» или «дальней» карбоксильной группы, с образованием соответствующих продуктов. Для простоты восприятия, на схеме указаны наиболее вероятные имидазопиримидин 5 и имидазоимидазолин 4.

В ЯМР¹H спектре предполагаемого метил 10-амино-2-оксо-2,10-дигидробензо[4,5]имидазо[1,2-*a*]пиримидин-4-карбоксилата 5, в отличие от исходного диамина 1, отсутствуют характерные сигналы протонов аминогруппы гидразинового фрагмента, а фиксируется сигнал протона пиримидинового цикла при $\delta=6.57$ м.д. Дополнительным подтверждением этого предположения, является сохранение сигналов аминогруппы гидразинового фрагмента. Ключевым критерием при выборе структуры полученных (между 4 и 5) соединений является присутствие кросс-пиков в спектре NOESY

между протонами метильной группы сложноэфирного фрагмента и протоном бензольного кольца в шестом положении изображенного на рисунке 1, реализация которых невозможно в случае имидазоимидазолина 4. Таким образом можно заключить, что в ходе взаимодействия диаминоимидазолов 1 и ДМАД однозначно образуется метиловый эфир 10-амино-2-оксо-2,10-дигидробензо[4,5]имидазо[1,2-*a*]пиримидин-4-карбоновой кислоты 5.

В качестве дополнительного способа доказательства структуры образующегося 10-амино-2-оксо-2,10-дигидробензо[4,5]имидазо[1,2-*a*]пиримидин-4-карбоксилата 5 нами была осуществлен ряд последовательных химических процессов (схема 2). Так, в ходе щелочного гидролиза с последующим декарбоксилированием (путь А) образовывались соответственно карбоновая кислота 6 и 10-аминобензо[4,5]имидазо[1,2-*a*]пиримидин-2(10*H*)-он 7. Стоит отметить, что оптимальными условиями щелочного гидролиза являлось кипячение эфира 5 в метаноле с использованием 2,5 избытка гид-

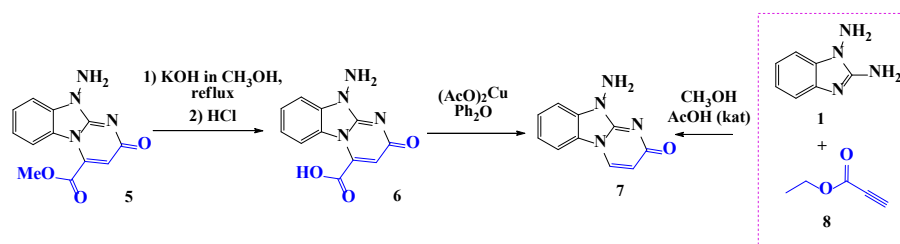


Схема 2

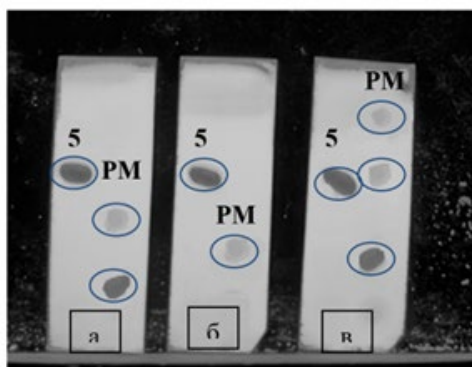


Рис. 2. Хроматографические профили реакционной массы (PM) процесса гидролиза метилового эфира имидазопиримидинкарбоновой кислоты 5.

Соотношение 5 с KOH: 1:1 (а); 1:2.5 (б); 1:3 (с).

Fig. 2. Chromatographic profiles of the reaction mass of the hydrolysis process of imidazopyrimidine carboxylic acid methyl ester 5. Ratio 5 with KOH: 1:1 (a); 1:2.5 (b); 1:3 (c).

роксида калия, а уменьшение или увеличение этого количества способствовало образованию трудно разделяемых смесей (контроль по ТСХ, рисунок 2).

Для соединения 7 был проведен его встречный синтез – взаимодействие 1,2-диаминобензимидазола 1 с этилпропаргилатом 8 (путь В). Как и в случае с ДМАД, оптимальным условием оказалось кипячение смеси реагентов в метаноле с добавлением пары капель уксусной кислоты в течение 60 минут при постоянном перемешивании реагентов. Строение выделенных соединений 6 и 7 доказано при помощи ЯМР¹H спектроскопии, NOESY и масс-спектрометрии.

Заключение

Таким образом, был предложен новый синтетический подход для удобного по-

Список литературы/References

1. Li J., Zhou G., Hong Y., Wang C., He W., Wang S., Chen Y., Wen Z., Wang Q. Copolymer of Pyrrole and 1,4-Butanediol Diglycidyl as an Efficient Additive Leveler

лучения функционализированных производных 10-аминобензо[4,5]имидазо-[1,2-а]пиримидина из легкодоступных 1,2-диаминобензимидазола и диметилацетилендикарбоксилата. Исследованием реакционных масс и конверсии исходного диаминина при помощи ВЭЖХ/МС анализа установлено, что оптимальными условиями процесса является часовое кипячение смеси реагентов в метаноле с добавлением каталитических количеств уксусной кислоты.

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.

for Through-Hole Copper Electroplating. *ACS Omega*. 2020; 5: 4868-4874. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03691>

2. Yang S., Thacker Z., Allison E., Bennett M., Cole N., Pinhero P. Electrodeposi-



- tion of Copper for Three-Dimensional Metamaterial Fabrication. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017; 9: 40921-40929. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b04721>
3. Gala D., Di Benedetto D.J., Kugelman M., Mitchell M.B. A novel synthesis of guanine PDE inhibitors via tricyclic imidazopyrimidines. *Tetrahedron Lett*. 2003; 44: 2721-2723. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)00383-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)00383-6)
4. Abdel-Mohsen H.T., Regab F. A.F., Ramla M.M., El Diwani H.I. Novel benzimidazole-pyrimidine conjugates as potent antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem*. 2010; 45: 2336-2344. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.011>
5. Chandra, Puttaraju, K.B., Mahesh S.S., Shivashankar K., Lokanath N.K., Madegowda M.J. Molecular docking studies of benzimidazopyrimidine and coumarin substituted benzimidazopyrimidine derivatives: As potential human Aurora A kinase inhibitors. *Biomed. Inform*. 2014; 10: 288-292. <https://doi.org/10.6026/97320630010288>
6. Rupert K.C., Henry J.R., Dodd J.H., Wadsworth S.A., Cavender D.E., Olini G.C., Fahmy B., Siekierka J.J. Imidazopyrimidines, potent inhibitors of p38 MAP kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2003; 13: 347-350. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)01020-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)01020-X)
7. Zobel A.W., Nickel T., Künzel H.E., Ackl N., Sonntag A., Ising M., Holsboer F. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J. Psychiatr. Res*. 2000; 34: 171-181. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(00\)00016-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(00)00016-9)
8. Binneman B., Feltner D., Kolluri S., Shi Y., Qiu R., Stiger T. A 6-Week Randomized, Placebo-Controlled Trial of CP-316,311 (a Selective CRH 1 Antagonist) in the Treatment of Major Depression. *Am. J. Psychiatry*. 2008; 165: 617-620. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07071199>
9. Coric V., Feldman H.H., Oren D.A., Anantha Shekhar M.D., Joseph Pultz, Randy C. Dockens, Xiaoling Wu, Kimberly A. Gentile B.S., Shu-Pang Huang, Eileen Emison, Terry Delmonte B.S., Bernadette B. D'Souza M.D., Daniel L. Zimbroff M.D., Jack A. Grebb M.D., Andrew W. Goddard M.D., Elyse G. Stock M.D. Multicenter, randomized, double-blind, active comparator and placebo-controlled trial of a corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonist in generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety*. 2010; 27: 417-425. <https://doi.org/10.1002/da.20695>
10. Clements-Jewery, S., Dansawan, G., Gardener C.R., Matharu S.S., Murdoch R., Tully W.R., Westwood R. Imidazo[1,2-a]pyrimidin-2-yl)phenylmethanones and related compounds as potential non-sedative anxiolytics. *J. Med. Chem*. 1988; 31: 1220-1226. <https://doi.org/10.1021/jm00401a025>
11. Meshram, H.M., Kumar A.S., Kumar G.S., Swetha A., Reddy B.Ch., Ramesh P. Boric acid promoted an efficient and practical synthesis of fused pyrimidines in aqueous media. *Pharma Chem*. 2012; 4: pp. 956-960.
12. Kojima T., Mochizuki M., Takai T., Hoashi Y., Morimoto S., Seto M., Nakamura M., Kobayashi K., Sako Y., Tanaka M., Kanzaki N., Kosugi Y., Yano T., Aso K. Discovery of 1,2,3,4-tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazoles as novel class of corticotropin releasing factor 1 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem*. 2018; 26: 2229-2250. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.020>
13. Rudenko R.V., Komykhov S.A., Musatov V.I., Konovalova I.A., Shishkin O.V., Desenko S.M. Reactions of N-arylmaleimides with 3-amino-1,2,4-triazole and 2-aminobenzimidazole. *J. Heterocycl. Chem*. 2011; 48: 888-895. <https://doi.org/10.1002/jhet.660>
14. Shikhaliev Kh.S., Potapov A.Yu., Kryl'skii D.V. 2-Aminobenzimidazole in three-component cyclization reactions with formaldehyde and primary amines. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed*. 2007; 56: 367-369. (In Russ.)



15. Shikhaliev H.S., Krylsky D.V., Potapov A.Y., Krysin M.Y., Trefilova I.N. Aminobenzimidazole in three-component condensation reactions. *Izv. vuzov. Chemistry and Chemical Technology*. 2004; 47: 149-150. (In Russ.)
16. Kovygin Yu.A., Shikhaliev Kh.S., Potapov Yu.A., Krylsky D.V. Aminoazoles in heterocyclisation reactions. *Izv. vuzov. Chemistry and Chemical Technology*. 2005; 48: 59-60. (In Russ.)
17. Romano C., Cuesta E., Avendaño C. Reactions of 1,2-Diaminobenzimidazoles with β -Dielectrophiles: Synthesis of Pyrimido[1,2-a]benzimidazole Derivatives. *Heterocycles*. 1990; 31: 267-276. <https://doi.org/10.3987/COM-89-5197>
18. Vandyshev D.Yu., Shikhaliyev Kh.S., Potapov A.Yu. Interaction of 1,2-diaminobenzimidazole with N-arylimides. *Eur. Chem. Bull.* 2015; 4: 424-427.
19. Vandyshev D.Y., Shikhaliev K.S., Kokonova A.V., Potapov A.Yu., Kolpakova M.G., Sabynin A.L., Zubkov F.I. A novel method for the synthesis of pyrimido[1,2-a]benzimidazoles. *Chem. Heterocycl. Compd.* 2016; 52: 493-497. <https://doi.org/10.1007/s10593-016-1914-7>
20. Morkovnik A.S., Kuz'menko T.A., Divaeva L.N., Borodkin G.S. 2-aryl(hetaryl)-4H-[1,2,4]triazolo[1,5-a]benzimidazoles. *Rus. J. Org. Chem.* 2013; 49: 895-903. <https://doi.org/10.1134/S107042801306016X>
21. Klyuev N.A., Povstyanoi M.V., Orlov V.M., Gnidets V.P., Kruglenko V.P. Study of the prototropic tautomerism in the 1,2,4-triazino[2,3-a]benzimidazol-(4h)-3-one system. *Chem. Heterocycl. Compd.* 1992; 28: 779-784. <https://doi.org/10.1007/BF00474492>
22. Kuz'menko T.A., Kuz'menko V.V., Pozharskii A.F., Simonov A.M. 1-Amino-2-alkylaminobenzimidazoles and their reactions with carbonyl-containing compounds. *Chem. Heterocycl. Compd.* 1988; 24: 880-884. <https://doi.org/10.1007/BF00479342>
23. Vandyshev D.Yu., Shikhaliev Kh.S. Recyclization of Maleimides by Binucleophiles as a General Approach for Building Hydrogenated Heterocyclic Systems. *Molecules*. 2022; 27: 5268. <https://doi.org/10.3390/molecules27165268>
24. Aouali M., Allouche F., Zouari I., Mhalla D., Trigui M., Chabchoub F. Synthesis, Antibacterial, and Antifungal Activities of Imidazo[2,1-c][1,2,4]triazoles and 1,2,4-Triazolo[4,3-a]pyrimidinones. *Synthetic Comm.* 2014; 44: 748-756. <https://doi.org/10.1080/00397911.2013.804576>
25. Hassanabadi A. PPh₃-Mediated One-Pot Synthesis of Functionalised 4-oxo-4H-benzo[4,5]imidazo[1,2,a]pyrimidines. *J. Chem. Res.* 2013; 37: 340-341. <https://doi.org/10.3184/2F174751913X13677735388608>
26. Nair M.D., Sudarsanam V., Desai J. A. Nitro imidazoles 12. reaction of 1 methyl 5 nitro imidazoles with acid chlorides. *Ind. J. Chem. - Sect. B Org. and Med. Chem.* 1982; 21: 1030-1032.
27. Bouvier M., Marinier A., Ruel R., René P., Chantigny Y., Dagneau P., Gingras S., Pyrazolopyridine and Pyrazolopyrimidine Derivatives as Melanocortin-4 Receptor Modulators. US9018395B2. U.S. Patent. 2012 January 26. WO2012/100342 A1, 2012.
28. Da Settimo F., Primofiore G., Da Settimo A., La Motta C., Taliani S., Simorini F., Novellino E., Greco G., Lavecchia A., Boldrini E. [1,2,4]Triazino[4,3-a]benzimidazole Acetic Acid Derivatives: A New Class of Selective Aldose Reductase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2001; 44: 4359-4369. <https://doi.org/10.1021/jm0109210>
29. Miyamoto Y. Synthesis of Nitrogen-Containing Heterocycles 12. Reactions of 2-Amino-1-benzylideneamino-1H-imidazoles with Dimethyl Acetylenedicarboxylate. *Heterocycles*. 2009; 78: 691-698. <https://doi.org/10.3987/COM-08-11558>
30. Pozharsky A.F., Anisimova V.A., Tsupak E.B. Practical work on the chemistry of heterocycles. Rostov, Publishing house of Rostov University, 1998, 106 p. (In Russ.)



Информация об авторах / Information about the authors

Д.Ю. Вандышев – к.х.н., доцент кафедры органической химии, доцент кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Т.Н. Хмелевская – к.х.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж Россия

В.Ю. Газин – магистр, кафедра органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

D.Yu. Vandyshev – Ph.D., Associate Professor of the Organic Chemistry Department, Associate Professor of High Molecular Compounds and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

T.N. Khmelevskaya – Ph.D., Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russian Federation

V.Yu. Gazin – master's student, Department of Organic chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Kh.S. Shikhaliev – grand Ph.D., Professor, Head of Organic Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 06.03.2023; одобрена после рецензирования 27.03.2023; принята к публикации 05.04.2023.

The article was submitted 06.03.2023; approved after reviewing 27.03.2023; accepted for publication 05.04.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 66.081.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11151

Анализ эффективности сорбционного удаления цинка из водных растворов нанокompозитом на основе оксида графена и углеродных нанотрубок

**Татьяна Сергеевна Кузнецова¹,
Александр Евгеньевич Бураков¹, Татьяна Владимировна Пасько¹,
Ирина Владимировна Буракова¹✉, Оксана Альбертовна Ананьева¹,
Анастасия Евгеньевна Меметова¹, Алексей Григорьевич Ткачев¹**

¹Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия, iris_tamb68@mail.ru✉

Аннотация. Современным подходом к решению задач экологической безопасности водных объектов является использование жидкофазных сорбционных методов, основанных на применении новых типов комплексных наноструктурированных адсорбентов. Углеродные наноматериалы и их модифицированные формы, обладающие уникальными физико-химическими и эксплуатационными характеристиками, позволяют обеспечить высочайшую эффективность очистки водных объектов. При этом наноматериалы могут обеспечить извлечение одновременно нескольких типов загрязнителей как органической, так и неорганической природы. Такое преимущество достигается за счет синергетического эффекта – развитой удельной поверхности наносорбентов наряду с возможностью химического модифицирования поверхности и привития широкого спектра активных функциональных групп. В работе проведены кинетические сорбционные исследования процесса извлечения ионов цинка Zn (II) синтезированными нанокompозитами. Данные материалы представляют собой сорбенты на основе восстановленного оксида графена и окисленных углеродных нанотрубок, модифицированных функциональным органическим компонентом – полианилином и фенолформальдегидной смолой. В работе оценивалось влияние режимных параметров получения нанокompозитов (карбонизация, метод сушки) на их сорбционную способность. Исследования проводились для аэрогелевой формы материалов, а также для карбонизированных аэрогеля и криогеля. Описание кинетики адсорбции проводилось с помощью следующих эмпирических моделей: псевдо-первого порядка, псевдо-второго порядка, модели Еловича. Механизм адсорбции цинка на полученных материалах исследовали с использованием диффузионных моделей – Морриса-Вебера (внутричастичная диффузия) и Бойда (пленочная диффузия). Результаты проведенных экспериментов показали, что за первые 10 мин была достигнута адсорбционная емкость аэрогеля, карбонизированного аэрогеля и карбонизированного криогеля – 200, 110, 178 мг/г, соответственно. Установлено, что поглощение осуществляется по смешанно-диффузионному механизму с вкладом химического взаимодействия между ионом металла и функциональными группами сорбента.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, оксид графена, полианилин, аэрогель, криогель, карбонизация, адсорбция, цинк, кинетика

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-20074, <https://rscf.ru/project/22-13-20074>

Для цитирования: Кузнецова Т.С., Бураков А.Е., Пасько Т.В., Буракова И.В., Ананьева О.А., Меметова А.Е., Ткачев А.Г. Анализ эффективности сорбционного удаления цинка из водных растворов нанокompозитом на основе оксида графена и углеродных нанотрубок // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 280-289. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11151>



Original article

Analysis of the efficiency of zinc sorption from aqueous solutions by nanocomposite based on graphene oxide and carbon nanotubes

Tatyana S. Kuznetsova¹, Alexander E. Burakov¹, Tatyana V. Pasko¹,
Irina V. Burakova¹✉, Oksana A. Ananyeva¹, Anastasia E. Memetova, Alexey G. Tkachev

¹Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation, iris_tamb68@mail.ru✉

Abstract. A modern approach to the solution of the problems of environmental safety of water bodies is the application of liquid-phase sorption methods based on the use of new types of complex nanostructured adsorbents. Carbon nanomaterials and their modified forms, which have unique physical, chemical and operational characteristics, provide the highest efficiency in water treatment. At the same time, nanomaterials can ensure the extraction of several types of pollutants, both organic and inorganic. This advantage is achieved due to the synergistic effect - the developed specific surface of nanosorbents along with the possibility of chemical modification of the surface and grafting a wide range of active functional groups. In this work, kinetic sorption studies of the extraction of Zn (II) zinc ions by synthesized nanocomposites were carried out. These materials are sorbents based on reduced graphene oxide and oxidized carbon nanotubes modified with a functional organic component, polyaniline, and phenol-formaldehyde resin. The influence of regime parameters of obtaining nanocomposites (carbonization, drying method) on their sorption capacity was evaluated. Studies were carried out for the aerogel materials, as well as for carbonized aerogel and cryogel. The adsorption kinetics was described using the following empirical models: pseudo-first order, pseudo-second order models, Elovich model. The mechanism of zinc adsorption on the obtained materials was studied using diffusion Weber-Morris (intraparticle diffusion) and Boyd (film diffusion) models. The results of the experiments showed that in the first 10 minutes the adsorption capacity of the aerogel, carbonized aerogel and carbonized cryogel was reached – 200, 110, and 178 mg/g, respectively. It has been established that the absorption is carried out according to the mixed-diffusion mechanism with the contribution of the chemical interaction between the metal ion and the functional groups of the sorbent.

Keywords: carbon nanotubes, graphene oxide, polyaniline, aerogel, cryogel, carbonization, adsorption, zinc, kinetics.

Acknowledgments: the study was supported by Russian Science Foundation grant (project No. 22-13-20074P, <https://rscf.ru/project/22-13-20074>).

For citation: Kuznetsova T.S., Burakov A.E., Pasko T.V., Burakova I.V., Ananyeva O.A., Memetova A.E., Tkachev A.G. Analysis of the efficiency of zinc sorption from aqueous solutions by nanocomposite based on graphene oxide and carbon nanotubes. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2023. 23(2): 280-289. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11151>

Введение

Растущее техногенное влияние современных промышленных предприятий и фабрик на качество и чистоту воды способствует активному росту исследований, посвященных эффективному удалению загрязнителей из водных сред с помощью адсорбционных методов [1, 2].

Опасными неорганическими загрязнителями водных сред являются тяжелые металлы – ртуть (Hg), кадмий (Cd), свинец (Pb), хром (Cr), цинк (Zn), медь (Cu), олово (Sn) и прочие. В частности, цинк

является жизненно важным микроэлементом, однако чрезмерное его потребление может привести к различным острым и хроническим побочным эффектам [3-5]. Предельно допустимая концентрация цинка в воде хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения составляет 1.0 мг/дм³ [6], в питьевой воде 5.0 мг/дм³ [7]. Очистка водных сред от ионов тяжелых металлов осуществляется рядом методов: мембранная фильтрация, ионный обмен, адсорбция, химическое осаждение, обратный осмос [4, 8]. Одним из наиболее эффективных является ад-

сорбция, в частности, на наноструктурированных материалах (оксид графена (ОГ), углеродные нанотрубки (УНТ) и др.) [4, 9-11]. В частности, УНТ, благодаря высокоразвитой поверхности, низкой массовой плотности, наличию эффективной пористости и простоте модифицирования, широко используются для удаления различных тяжелых металлов [2]. При этом увеличение доступности и функциональности поверхности УНТ достигается, например, посредством окисления.

Существует ряд проблем, которые ограничивают применимость наноматериалов. Довольно серьезной проблемой при использовании графена в качестве адсорбента является его склонность к агрегации и переукладке графеновых листов из-за ван-дер-ваальсовых сил между ними. Одним из способов решения данной проблемы считается создание упорядоченной пористой структуры, а именно, каркасных композитов с помощью сверхкритической сушки и лиофилизации. Данные материалы не только имеют большую удельную поверхность, но и сочетают различные функциональные свойства всех компонентов композита [4, 12-15]. Например, для очистки воды от ионов цинка Zn^{2+} использовали коммерческие одностенные и многостенные УНТ [16]. Для придания гидрофильности УНТ были термообработаны при $350^{\circ}C$ в течение 30 минут, очищены 70%-ым раствором гипохлорита натрия, и подвергнуты ультразвуковой очистке в течение 20 минут на водяной бане (при $85^{\circ}C$). Адсорбционная емкость по Zn^{2+} составила 43.66 мг/г. В работах [5, 17] исследована сорбция ионов цинка Zn^{2+} на углеродных аэрогелях. Также довольно часто углеродные аэрогели проходят дополнительный этап обработки – карбонизацию [14, 18, 19].

В настоящей статье проведены кинетические исследования сорбции ионов цинка из модельных растворов на нано-

композитных материалах, матрицей которых являются УНТ и ОГ, модифицированные полианилином (ПАНИ) и фенолформальдегидной смолой (ФФС). Также авторами осуществлялась оценка влияния способов сушки на сорбционную способность материалов.

Экспериментальная часть

Для синтеза нанокompозитных материалов применялись приборы, материалы и реактивы, аналогичные работе [15]. Предварительно получены нанокompозитные гидрогели на основе восстановленного оксида графена (в-ОГ) и окисленных углеродных нанотрубок (о-УНТ), модифицированных функциональным органическим компонентом – полианилином и фенолформальдегидной смолой [15]. Все графеновые наноматериалы в окисленной и восстановленной форме были приобретены в ООО «НаноТех-Центр», г. Тамбов. Окисленные УНТ (с массовым содержанием 11.48% сухого вещества) получены путем окисления раствором гипохлорита натрия многостенных УНТ марки «Таунит - М» (внешний диаметр – 10-20 нм, внутренний диаметр – 5-15 нм, ориентация графеновых слоев - цилиндрическая). в-ОГ (с массовым содержанием 2,42% сухого вещества) получен путем восстановления аскорбиновой кислотой 1% суспензии ОГ. Согласно открытым данным на сайте организации, данная водная дисперсия ОГ производится в промышленных масштабах по модифицированной методике Хаммерса [20]. Технология запатентована (патент РФ № 2709594 «Способ получения оксида графена» [21]). В указанной работе были получены четыре формы образцов – аэрогель, полученный по технологии сверхкритических флюидов (АС); аэрогель, полученный лиофильной

Таблица 1. Оценка параметров пористого пространства рассматриваемых композитов
 Table 1. Estimation of the nanocomposites porous space parameters.

Нанокompозит	Удельная поверхность материала (ВЕТ), м ² /г	Удельная поверхность (DFT), м ² /г	Объем пор (DFT), см ³ /г	Размер пор (DFT), нм
АС	290	189	0.314	1.410
АСК	315	245	0.768	1.126
АЛК	290	238	0.324	1.126

сушкой (АЛ); карбонизированный аэрогель (АСК) и карбонизированный криогель (АЛК). В таблице 1 приведены параметры пористой структуры рассматриваемых в работе композитов.

Для проведения кинетики сорбции ионов цинка готовили модельный раствор $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ с начальной концентрацией 100 мг/дм³ в буфере с рН=6. Эксперименты проводили в статических условиях: в 30 см³ раствора нитрата цинка добавляли 0.01 г сорбента, для лучшего контакта фаз пробирки помещали в программируемый ротатор (Multi-Rotator BioSan) для перемешивания со скоростью вращения 120 об/мин. Время контакта варьировалось от 2 до 60 мин. После раствор фильтровали для отделения твердой фазы и определяли конечную концентрацию ионов цинка с помощью энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии (спектрометр ARLQuant ThermoScientific, ThermoScientific, США).

Обсуждение результатов

На рис. 1 представлено влияние времени контакта на сорбционную емкость ионов Zn^{2+} для всех исследуемых адсорбентов. Равновесное время достигается через 10 мин. Следует отметить, что характер протекания сорбции – стремительный, за первые 10 мин достигается равновесие в системе «сорбат-сорбент» и кинетическая кривая выходит на плато. Из всех рассматриваемых нанокompозитов наиболее эффективным оказался аэрогель.

В данной работе обработка массива кинетических экспериментальных данных проводилась с использованием моделей адсорбции, таких как псевдо-первого порядка, псевдо-второго порядка и Еловича.

Кинетическая модель псевдо-первого и второго порядков выражается с помощью формул (1) и (2), соответственно [22, 23]:

$$q_t = q_e (1 - \exp(-k_1 t)) \quad (1)$$

$$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t} \quad (2)$$

Кинетическая модель Еловича выражается с помощью уравнения [24]:

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(1 + \alpha \beta t) \quad (3)$$

где q_e – количество ионов Zn^{2+} , адсорбированного при равновесном времени t (мг/г); q_t – количество ионов Zn^{2+} , адсорбированного в момент времени t (мг/г); k_1 – константа скорости адсорбции псевдо-первого порядка (мин⁻¹); k_2 – константа скорости адсорбции псевдо-второго порядка (г·(мг·мин)⁻¹); α (г/мг) и β (мг/г·мин) – константы уравнения Еловича.

Обработка вышеуказанными моделями экспериментальных кинетических результатов показана на рис. 1. На основании этих результатов были определены расчетные кинетические параметры адсорбции ионов Zn^{2+} на АС, АСК и АЛК, которые представлены в табл. 2. Из полученных результатов можно сделать вывод, что модель кинетики псевдо-первого порядка дает самые высокие значения коэффициента корреляции R^2 (0.9965-

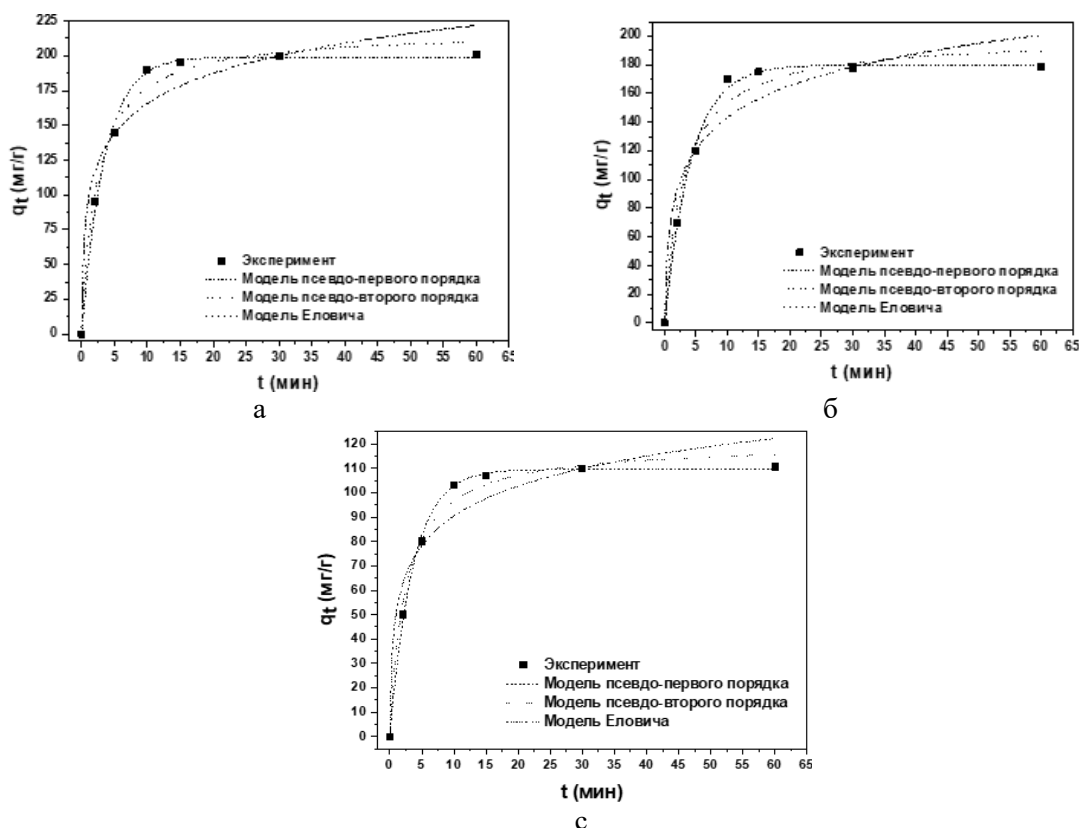


Рис. 1. Графическое представление моделей псевдопервого, псевдовторого порядка и Еловича процесса адсорбции ионов Zn^{2+} на АС (а), АСК (б) и АЛК (с)
 Fig. 1. Graphical representation of the pseudo-first, pseudo-second order and Elovich models of the adsorption process of Zn^{2+} ions on AS (a), ASC (b) and ALC (c)

Таблица 2. Значения кинетических параметров адсорбции ионов Zn (II)
 Table 2. The values of the kinetic parameters of the adsorption of Zn (II) ions

Материал	Эксперимент	Модель псевдо-первого порядка			Модель псевдо-второго порядка			Модель Еловича		
		q_e	k_1	R^2	k_2	q_e	R^2	β	α	R^2
АС	~200	0.290	199.2	0.9965	0.002	218.1	0.9899	0.031	$6.14 \cdot 10^2$	0.9492
АСК	~178	0.239	179.8	0.9971	0.002	199.2	0.9788	0.030	$2.69 \cdot 10^2$	0.9277
АЛК	~110	0.280	109.5	0.9983	0.003	120.2	0.9906	0.056	$1.07 \cdot 10^2$	0.9484

0.9983) для всех исследуемых материалов. Кроме того, отклонения между экспериментальными и расчетными значениями (q_e) по уравнению кинетики псевдо-первого порядка по сравнению с моделью псевдо-второго порядка, минимальные (менее 1%). Следовательно, модель псевдо-первого порядка может быть использована для описания кинетики адсорбции ионов Zn^{2+} на рассматриваемых материалах.

Механизм адсорбции ионов Zn^{2+} на трех полученных адсорбентах также изучали с помощью диффузионных моделей, таких как Морриса-Вебера (внутричастичная диффузия) и Бойда (пленочная диффузия).

Диффузионные модели Морриса-Вебера и Бойда выражаются с помощью формул (4) и (5), соответственно [25, 26]:

$$q_t = k_{id} \cdot t^{1/2} + C \quad (4)$$

$$F = 1 - \left(\frac{6}{\pi^2}\right) \exp(-Bt) \quad (5)$$

Таблица 3. Значения параметров диффузионных моделей
 Table 3. Parameter values of diffusion models

Материал	Модель Морриса-Вебера			Модель Бойда
	k_{id}	C	R^2	R^2
АС	54.22	20.19	0.9958	0.9627
АСК	57.13	9.75	0.9988	0.9737
АЛК	30.20	9.08	0.9918	0.9818

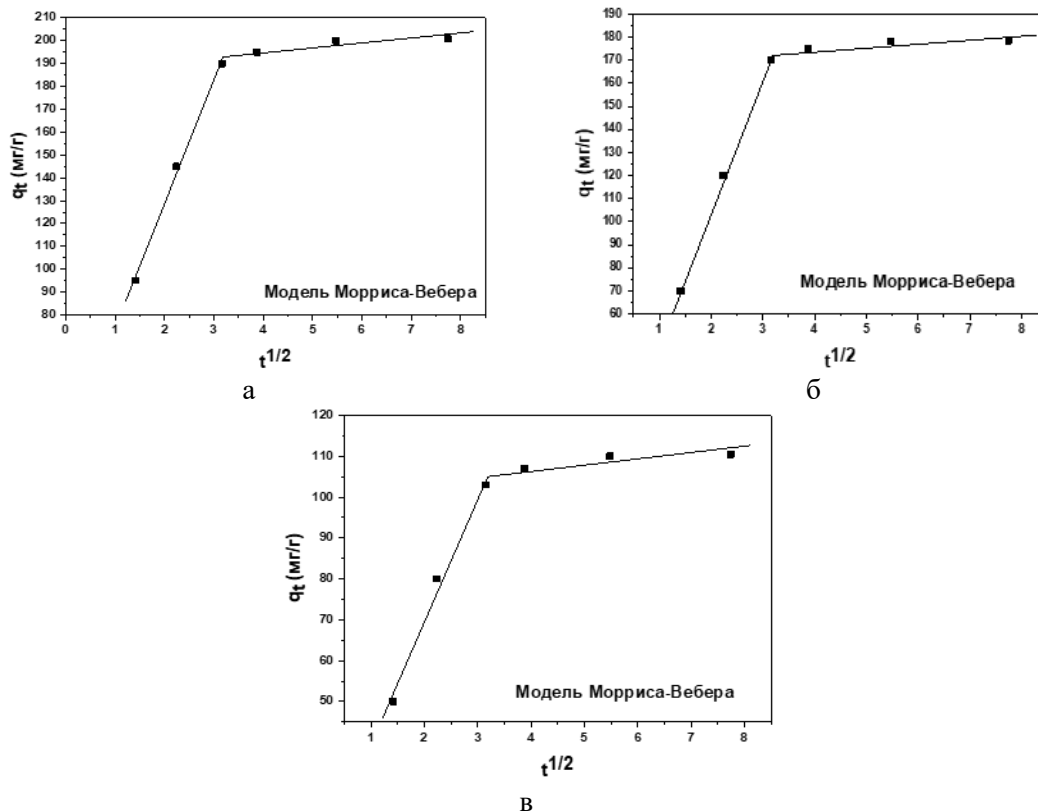


Рис. 2. Графики модели Морриса-Вебера для адсорбции ионов Zn^{2+} на АС (а), АСК (б) и АЛК (в)

Fig. 2. Graphs of the Weber-Morris model for the adsorption process of Zn^{2+} ions on AS (a), ASC (b) and ALC (c)

$$B_t = 0.4977 - \ln(1 - q_t/q_e) \quad (6)$$

где k_{id} – константа скорости внутричастичной диффузии ($mg/g \cdot min^{-1/2}$); C – параметр, связанный с толщиной пограничного слоя (mg/g); F – доля вещества, адсорбированного в разное время t (mg/g); Bt – функция F .

Модель внутричастичной диффузии сформулирована на основе модели Вебера и Морриса и используется для определения стадии, ограничивающей скорость процесса адсорбции (табл. 3). Как правило, вещества, присутствующие в

растворе, адсорбируются путем массопереноса. Как правило, вещества, присутствующие в растворе, адсорбируются путем массопереноса - поверхностная, пленочная диффузия и диффузия через поры.

Хорошо известно, что если графики зависимости q_t от $t^{1/2}$ являются линейными и проходят через начало координат, то диффузия внутри частиц является стадией, контролирующей скорость [25]. На рис. 2 показаны графики модели Вебера и Морриса из которых видно, что для всех полученных адсорбентов они являются

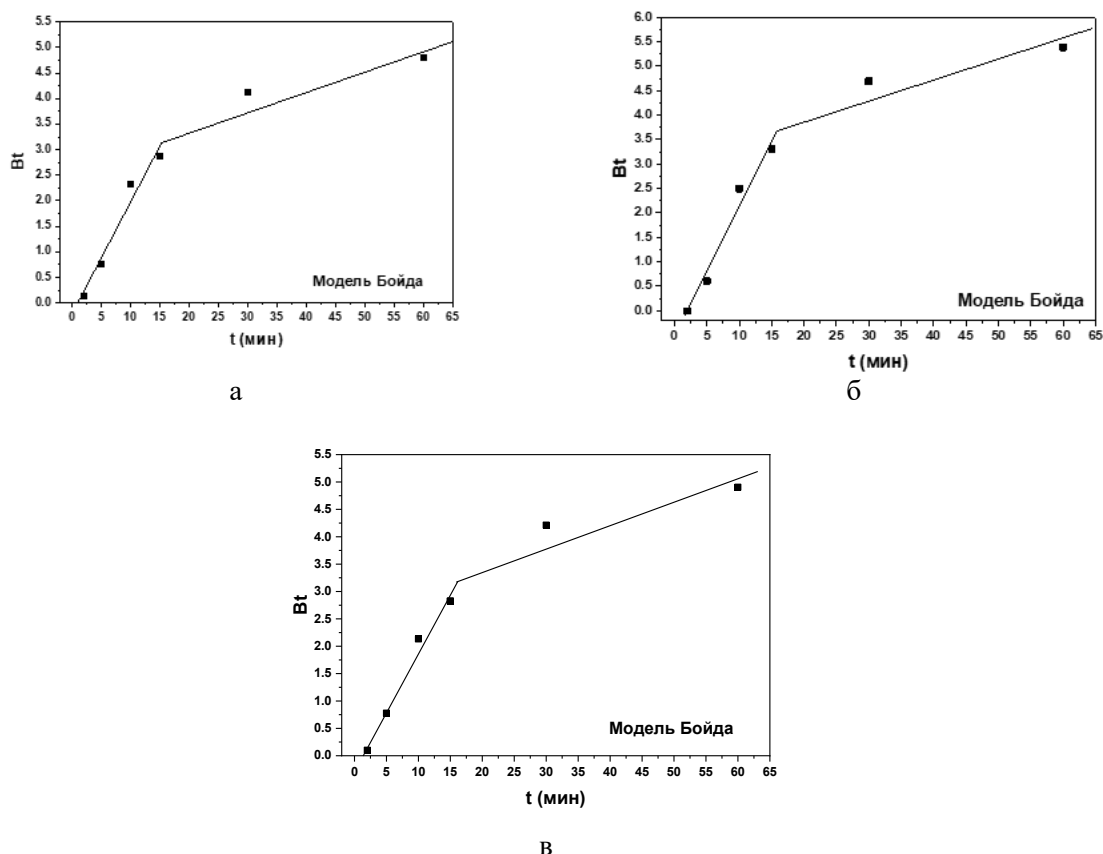


Рис. 3. Графики модели Бойда для адсорбции ионов Zn^{2+} на АС (а), АСК (б) и АЛК (в)
Fig. 3. Graphs of the Boyd model for the adsorption process of Zn^{2+} ions on AS (a), ASC (b) and ALC (c)

билинейными (т. е. сорбция Zn^{2+} сопровождается двумя отдельными стадиями). Первая более резкая ступень связана с диффузией ионов Zn^{2+} в пограничном слое. Вторая ступень соответствует стадии конечного равновесия. Кроме того, первый линейный участок не проходит через начало координат для всех полученных адсорбентов ($C > 0$; $R^2 > 0.99$; табл. 2). Самое большое значение C наблюдалось на АС, указывающее на высокую начальную сорбцию Zn^{2+} с диффузией через раствор на внешнюю поверхность адсорбента через толстый пограничный слой.

Модель Бойда используется для понимания является ли пленочная диффузия шагом, контролирующим скорость процесса адсорбции. Бойд пришел к выводу, что внешняя поверхность вокруг адсорбента оказывает большое влияние на диффузию адсорбата [26]. Согласно этой модели, поровая диффузия контролирует

перенос массы, когда график является линейным и проходит через начало координат. На рис. 3 показаны графики модели Бойда для адсорбции Zn^{2+} на всех исследуемых адсорбентах.

Из рисунка 3 можно сделать вывод, что графики для всех исследуемых материалов не проходят через начало координат. Поэтому скорость контролируется пленочной диффузией или химической реакцией.

Заключение

В работе проведено кинетическое исследование процесса извлечения ионов цинка на гибридных нанокompозитных материалах, синтезированных на основе о-УНТ и в-ОГ, модифицированных ПАНИ и ФФС. Также проведена оценка влияния методов сушки на сорбционную способность указанных материалов. В результате статических кинетических исследований выявлено, что равновесное



время сорбции для каждого материала составило 10 мин. Установлено, что кинетика сорбции по всем материалам удовлетворительно описывается моделью псевдо-первого порядка, отвечающей за «сорбат-сорбент» взаимодействие. Адсорбционная емкость для АС составила 200 мг/г, АСК – 178 мг/г, АЛК – 110 мг/г. При оценке вклада диффузии в общую скорость процесса установлено, что процесс поглощения имеет смешанно-диф-

фузионный характер. При этом предположительно скорость адсорбции контролируется пленочной диффузией.

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. Mukhin V.M., Burakova I.V., Burakov A.E. Active carbon as nanoporous material for solving environmental problems. *Advanced Materials & Technologies*. 2017; 2: 50-56. <https://doi.org/10.17277/amt.2017.02.pp.050-056>
2. Rajendran S., Priya A.K., Kumar P. S., Hoang T.K.A., Sekar K., Chong K.Y., Khoo K.S., Ng H.S., Show P.L. A critical and recent developments on adsorption technique for removal of heavy metals from wastewater-A review. *Chemosphere*. 2022; 303(2): 135146. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135146>
3. Scherz H., Kirchhoff E. Trace elements in foods: Zinc contents of raw foods – A comparison of data originating from different geographical regions of the world. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; 19(5): 420-433. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.10.004>
4. Torres C.E.I., Quezada T.E.S., Kharissova O.V., Kharisov B.I., Gomez M.I. Carbon-based aerogels and xerogels: Synthesis, properties, oil sorption capacities, and DFT simulations. *J. Environ. Chem. Eng*. 2021; 9(1): 104886. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104886>
5. Meena A.K., Mishra G.K., Rai P.K., Pajagopal C., Nagar P.N. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions using carbon aerogel as an adsorbent. *J. Hazard. Mater*. 2005; 122(1-2): 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.024>
6. Tsink v stochnykh vodakh. Available at: <https://nortest.pro/stati/voda/cink-v-stochnyh-vodah.html> (accessed 1 December 2022).
7. Sanitarnye pravila i normy SanPiN1.2.3685-21 «Gigienicheskie normativy i trebovaniya k obespecheniyu bezopasnosti i (ili) bezvrednosti dlya cheloveka faktorov sredey obitaniya». Available at: <https://docs.cntd.ru/document/573500115#6540IN> (accessed 1 December 2022).
8. Godwin P.M., Pan Y., Xiao H., Afzal M.T. Progress in preparation and application of modified biochar for improving heavy metal ion removal from wastewater. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2019; 4(1): 31-42. <https://doi.org/10.21967/jbb.v4i1.180>
9. Qian H., Wang J., Yan L. Synthesis of lignin-poly(N-methylaniline)-reduced graphene oxide hydrogel for organic dye and lead ions removal. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2020; 5(3): 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.07.006>
10. Burakov A.E., Galunin E.V., Burakova I.V., Kucherova A.E., Agarwal S., Tkachev A.G., Gupta V.K. Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 2018; 148: 702-712. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.034>
11. Adel M., Ahmed M.A., Elabiad M.A., Mohamed A.A. Removal of heavy metals and dyes from wastewater using graphene oxide-based nanomaterials: A critical review. *Environmental Nanotechnology*,



- Monitoring and Management*. 2022; 18: 100719.
<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100719>
12. Huo P., Xing G., Tian L., Zhang G., Wang H., Yu C., Li Y., Wu Z. Hollow carbon spheres/graphene hybrid aerogels as high-performance adsorbents for organic pollution. *Sep. Purif. Technol.* 2019; 213: 524-532. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.12.032>
13. Deshwal N., Singh M.B., Bahadur I., Kaushik N., Kaushik N.K., Singh P., Kurami K. A review on recent advancements on removal of harmful metal/metal ions using graphene oxide: Experimental and theoretical approaches. *Sci. Total Environ.* 2023; 858: 159672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159672>
14. Pinelli F., Piras C., Rossi F. A perspective on graphene based aerogels and their environmental applications. *FlatChem*. 2022; 36: 100449. <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2022.100449>
15. Kuznetsova T.S., Burakova I.V., Pasko T.V., Burakov A.E., Melezhik A.V., Mkrtychyan E.S., Babkin A.V., Neskornaya E.A., Tkachev A.G. Technology of nanocomposites preparation for sorption purification of aqueous media. *Inorg. Mater.: Appl. Res.* 2022; 16(2): 434-441. <https://doi.org/10.1134/S2075113322020447>
16. Lu C., Chiu H. Adsorption of zinc(II) from water with purified carbon nanotubes. *Chem. Eng. Sci.* 2006; 61(4): 1138-1145. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.08.007>
17. Gan G., Li X., Fan S., Wang L., Qin M., Yin Z., Chen G. Carbon Aerogels for Environmental Clean-Up. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2019; 2019(27): 3126-3141. <https://doi.org/10.1002/ejic.201801512>
18. Maleki H. Recent advances in aerogels for environmental remediation applications: A review. *Chem. Eng. J.* 2016; 300: 98-118. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.098>
19. Lee J-H., Park S-J. Recent advances in preparations and applications of carbon aerogels: A review. *Carbon*. 2020; 163: 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.02.073>
20. Hummers W.S., Offeman R.E. Preparation of graphitic oxide. *Journal of American Chemical Society*. 1958; 80(6): 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>
21. Tkachev A.G., Melezhik A.V., Osipov A.A., Tkachev M.A. Patent RF, no. 2709594, 2019.
22. Lagergren S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. *Sven. Vetenskapsakad. Handlingar*. 1898; 24: 1-39.
23. Ho Y., McKay G. The sorption of lead (II) ions on peat. *Water Research*. 1999; 33(2): 578-584.
24. McLintock I. The Elovich equation in chemisorption kinetics. *Nature*. 1967; 216(5121): 1204.
25. Weber W., Morris J. Intraparticle diffusion during the sorption of surfactants onto activated carbon. *Journal of the Sanitary Engineering Division*. 1963; 89(1): 53-61.
26. Boyd G.E., Adamson A.W., Myers Jr L.S. The exchange adsorption of ions from aqueous solutions by organic zeolites, II: Kinetics. *Journal of the American Chemical Society*. 1947; 69: 2836-2848.

Информация об авторах / Information about the authors

Т.С. Кузнецова – к.т.н., ассистент кафедры Техника и технологии производства нанопроductов, Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

А.Е. Бураков – к.т.н., доцент кафедры Техника и технологии производства нанопроductов, Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

T.S. Kuznetsova – Ph.D., Assistant of the Department of Equipment and Technologies of Nanoproducts Production, Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation, E-mail: kuznetsova-t-s@yandex.ru

A.E. Burakov – Ph.D., Associate Professor of the Department of Equipment and Technologies of Nanoproducts Production, Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation, E-mail: malex1983@yandex.ru



Т.В. Пасько – к.т.н., доцент кафедры Техника и технологии производства нанопродуктов, Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

И.В. Буракова – к.т.н., доцент кафедры Техника и технологии производства нанопродуктов, Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

О.А. Ананьева – магистрант, Техника и технологии производства нанопродуктов, Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

А.Е. Меметова – к.т.н., доцент кафедры Техника и технологии производства нанопродуктов, Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

А.Г. Ткачев – д.т.н., профессор, кафедры Техника и технологии производства нанопродуктов, Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

T.V. Pasko – Ph.D., Associate Professor of the Department of Equipment and Technologies of Nanoproductions Production, Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation, E-mail: tpasko@yandex.ru

I.V. Burakova – Ph.D., Associate Professor of the Department of Equipment and Technologies of Nanoproductions Production, Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation, E-mail: iris_tamb68@mail.ru

O.A. Ananyeva – Master's Degree Student of the Department of Equipment and Technologies of Nanoproductions Production, Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation, E-mail: oksana.a9993471@gmail.com

A.E. Memetova – Ph.D., Associate Professor of the Department of Equipment and Technologies of Nanoproductions Production, Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation, E-mail: anastasia.90k@mail.ru

A.G. Tkachev – D. Sc. (Eng.), Professor, Head of the Department of Equipment and Technologies of Nanoproductions Production, Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation, E-mail: nanotam@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 29.12.2022; одобрена после рецензирования 04.04.2023; принята к публикации 05.04.2023.

The article was submitted 29.12.2022; approved after reviewing 04.04.2023; accepted for publication 05.04.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11152

Разработка эффективного метода очистки ДНК при бисульфитной конверсии с использованием оксида кремния в качестве сорбента

**Галина Борисовна Анохина¹,
Александр Юрьевич Селиванов¹, Артём Сергеевич Грязев¹,
Александр Трофимович Епринцев¹[✉], Оксана Евгеньевна Чухлебова¹**

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru[✉]

Аннотация. Метилирование ДНК – один из самых изученных механизмов эпигенетической регуляции генома, который контролирует экспрессию генов растений и животных. Разработка эффективных методов анализа метильного статуса генов имеет огромное значение, так как обработка ДНК бисульфитом натрия – многоэтапный и трудоемкий процесс, в котором недопустимы большие потери целевого продукта. Именно поэтому чистота модифицированной ДНК играет решающую роль в последующем процессе амплификации. Наличие в исследуемых образцах высоких концентраций различных солей и примесей способно ингибировать полимеразную активность ДНК-полимеразы. В типичных протоколах, описывающих методику конверсии ДНК бисульфитом натрия, для очистки модифицированной ДНК используют коммерческие наборы, однако их применение нередко приводит к большим потерям целевого продукта, что существенно снижает эффективность процесса очистки. Кроме того, в условиях большого объема анализируемых образцов применение коммерческих наборов существенно повышает стоимость работ. В рамках исследования разработан эффективный, простой и недорогой способ очистки модифицированной ДНК от солей путём сорбции на диоксид кремния (SiO₂). Применение в качестве сорбента мелкодисперсного диоксида кремния обусловлено его способностью селективно связываться с молекулами отрицательно заряженной ДНК. Анализ конвертированной и очищенной ДНК методом электрофореза в 2% агарозном геле позволил установить, что потери целевого продукта в ходе многостадийной обработки бисульфитом натрия составили порядка 33%. Проведение метил-специфичной ПЦР с использованием праймеров к отдельным CpG-динуклеотидам в составе промотора гена GDH2 глутаматдегидрогеназы кукурузы (*Zea mays L.*) отмечено, что полученные ампликоны соответствовали теоретическому размеру – 175 п.н., 203 п.н. и 275 п.н. к первому, второму и третьему анализируемому CpG-динуклеотиду, соответственно. В связи с этим, можно утверждать, что конвертированная и сорбированная на диоксид кремния матрица пригодна для анализа метильного статуса ДНК.

Ключевые слова: эпигенетика, метилирование, ДНК, очистка, бисульфит натрия, метил-специфичная ПЦР
Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУзам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

Для цитирования: Анохина Г.Б., Селиванов А.Ю., Грязев А.С., Епринцев А.Т., Чухлебова О.Е. Разработка эффективного метода очистки ДНК при бисульфитной конверсии с использованием оксида кремния в качестве сорбента // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 290-298. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11152>

Original article

Development of an effective method for DNA purification during bisulphite conversion using silicon oxide as a sorbent

Galina B. Anokhina¹, Alexander Yu. Selivanov¹, Artem S. Gryazev¹,



Alexander T. Eprintsev¹✉, Oksana E. Chukhlebova¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru ✉

Abstract. DNA methylation is one of the most studied mechanisms of epigenetic regulation of the genome, which controls gene expression in plants and animals. The development of effective methods for analysing the methyl status of genes is of great importance, since DNA treatment with sodium bisulphite is a multi-stage and labour-intensive process in which significant losses of the target product are unacceptable. The purity of the modified DNA plays a decisive role in the subsequent amplification process. The presence of high concentrations of various salts and impurities in the studied samples can inhibit the polymerase activity of DNA polymerase. In typical protocols describing the method of DNA conversion with sodium bisulphite, commercial kits are used for the purification of modified DNA, but their use often leads to large losses of the target product, which significantly reduces the efficiency of the purification process. In addition, due to large volume of analysed samples, the use of commercial kits significantly increases the cost of work. As part of the study, an effective, simple and inexpensive method was developed for purification of modified DNA from salts by sorption on silicon dioxide (SiO₂). The use of finely dispersed silicon dioxide as a sorbent is due to its ability to selectively bind negatively charged DNA molecules. Analysis of the converted and purified DNA by electrophoresis in 2% agarose gel allowed to establish that the loss of the target product during the multistage treatment with sodium bisulphite was about 33%. The methyl-specific PCR using primers to individual CpG dinucleotides in the promoter of the *GDH2* gene of maize (*Zea mays* L.) glutamate dehydrogenase demonstrated that the obtained amplicons corresponded to the theoretical size – 175 bp, 203 bp and 275 bp to the first, second and third analysed CpG dinucleotide, respectively. Therefore, it was shown that the matrix converted and adsorbed on silicon dioxide is suitable for the analysis of the DNA methyl status.

Keywords: DNA methylation, purification, sodium bisulphite, methyl-specific PCR.

Acknowledgments: this work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state order for universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project no. FZGU-2023-0009

For citation: Anokhina G.B., Selivanov A.Yu., Gryazev A.S., Eprintsev A.T., Chukhlebova O.E. Development of an effective method for DNA purification during bisulphite conversion using silicon oxide as a sorbent. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 290-298. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11152>

Введение

Метилирование ДНК – один из вариантов эпигенетической регуляции работы генома эукариотической клетки, которое в своем «классическом» варианте представляет собой ковалентное присоединение метильной группы в 5'-положение цитозинового основания. Данный процесс осуществляется посредством функционирования ДНК-метилтрансфераз, которые специфически присоединяют СН₃-группу к CpG-динуклеотидам, входящим в состав гена, образуя 5-метилцитозин и поддерживая паттерн метилирования ДНК в геноме. CpG-динуклеотиды представляют собой располагающиеся рядом цитозин и гуанин, разделенные фосфатом (5'-C-phosphate-G-3'). Скопления CpG-динуклеотидов в составе молекулы ДНК образуют CpG-островки [1]. Увеличение степени метилирования ДНК – промоторных областей в телах генов

приводит к снижению или полному подавлению экспрессии этих генов, в то время как снижение доли метилированных цитозинов наоборот приводит к увеличению/ индукции их транскрипционной активности. Метилирование ДНК способствует изменению пространственной структуры хроматина, приводя к компактизации хроматина, тем самым препятствуя экспрессии гена [2].

Метилирование ДНК животных организмов преимущественно затрагивает симметричные CpG-динуклеотиды и метилирование по сайтам CpNpG (где N – это А, Т или С) и CpNpN практически не встречается. Для растительных организмов, метилирование в районах CpG-островков тоже является доминирующим, однако метилирование CpNpG и CpNpN – участков встречается довольно часто. Имеются данные, что около 30% всего

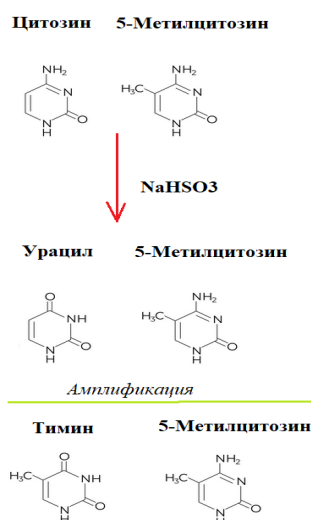


Рис. 1 Схема бисульфитной конверсии
Fig. 1 Scheme of bisulphite conversion

эпигенома гексаплоидной пшеницы метилировано по сайтам CpNpG[3].

В настоящее время в качестве основного способа исследования метильного статуса генома эукариотической клетки применяют бисульфитную конверсию ДНК. Принципиальная основа метода заключается в обработке ДНК бисульфитом натрия (NaHSO_3), в результате чего неметилированный цитозин дезаминируется с образованием урацила (рис.1). Урацил в составе ДНК, при последующей амплификации, распознается ДНК-зависимой ДНК-полимеразой как тимин. При этом, цитозин, связанный с CH_3 -группой, остается в неизменном состоянии. На основании этого было разработано несколько методов, позволяющих оценить метильный статус как отдельных CpG-динуклеотидов, так и целого генома [4].

Анализ современных методик бисульфитной конверсии

Метил-специфичная ПЦР. Метод метил-специфичной ПЦР позволяет исследовать изменение метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в динамике. Принцип метода заключается в предварительном анализе отдельных участков гена на наличие CpG-островков, а в случае растительных организмов и несимметричных сайтов метилирования. Выбираются отдельные CpG-динуклеотиды,

которые будут в дальнейшем исследоваться. Именно к областям ДНК, содержащим выбранные CpG-динуклеотиды, подбираются два комплекта праймеров: М-праймеры, подобранные с учетом того, что цитозин в составе этого динуклеотида метилирован и U-праймеры, подобранные с учетом того, что цитозин находится в неметилированном состоянии. Следующим этапом исследования является проведение ПЦР по отдельности с каждым комплектом праймеров. В качестве матрицы используют ДНК, предварительно подвергнутую модификации бисульфитом натрия.

Анализ продуктов амплификации проводят методом электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии маркера. Наличие ПЦР-продуктов в образцах, амплифицированных с М-комплексом праймеров, указывает на то, что исследуемый CpG-динуклеотид находится в метилированном состоянии. В случае, если ампликон детектировался в образцах, отжиг которых осуществлялся с U-комплексом праймеров, данный исследуемый CpG-динуклеотид был неметилирован. Преимуществом метода является возможность «точно» исследовать метильный статус выбранной области гена.

Бисульфитное секвенирование. Бисульфитное секвенирование является

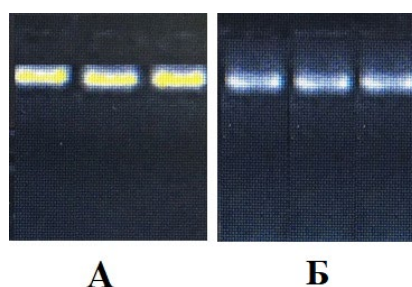


Рис. 2 Типичная электрофореграмма ДНК: А – ДНК до обработки бисульфитом натрия; Б – ДНК после обработки бисульфитом натрия
Fig. 2 Typical DNA electropherogram: А – DNA before treatment with sodium bisulphite; В – DNA after treatment with sodium bisulphite

наиболее удобным и информативным с точки зрения исследователя методом оценки степени метилирования гена. Суть метода заключается в модификации ДНК бисульфитом натрия с последующей амплификацией с одним комплектом праймеров, который подобран к областям, лишенным возможных сайтов метилирования. Полученный ампликон секвенируют. Результаты секвенирования анализируют с помощью специального программного обеспечения, которое позволяет оценить метильный статус нуклеотидов на основе сравнения исходной последовательности и полученного ампликона, синтезированного с матрицы модифицированной ДНК. Преимуществом метода является возможность исследовать достаточно большой участок ДНК.

В зависимости от целей и задач исследования применяются различные методы анализа метильного статуса ДНК. Как правило, большая часть из них предполагает проведение обработки ДНК бисульфитом натрия. При этом, данный процесс проводится в несколько этапов: денатурация ДНК, собственно бисульфитная конверсия, очистка ДНК от солей бисульфита, десульфитирование.

Важным этапом является очистка ДНК от солей бисульфита натрия, что связано в первую очередь с тем, что они могут выступать в качестве сильного ингибитора работы множества ферментов, в том числе и ДНК-зависимых ДНК-полимераз, а следовательно, и препятствовать

амплификации. Подавляющее число протоколов бисульфитной обработки предполагают использование на этапе очистки коммерческих наборов, позволяющих быстро очистить конвертированную ДНК. Однако, в данном случае, чаще всего происходят большие потери целевого продукта, что снижает эффективность процесса очистки. Кроме того, такой способ не подходит в том случае, когда объем исследуемых образцов достаточно велик, что требует больших финансовых затрат.

В связи с этим, целью исследования была разработка простого, эффективного и недорогого метода очистки ДНК, конвертированной бисульфитом натрия от солей.

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.

Выделение ДНК. Выделение ДНК осуществлялось путем лизиса растительной ткани в буфере, содержащем: 2% ЦТАБ, 1.4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 0.1 М Трис-HCl (pH 8.0) [5]. Качественный анализ выделенной ДНК осуществлялся путем проведения электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия при силе тока 50-100 мА, напряжении электрического поля 140В, продолжительность разделения фрагментов ДНК – 30 минут [6-8]. Для визуализации

использовали трансиллюминатор Serva Blue cube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) с длиной волны 312 нм (рис.2а).

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) в 0.09% растворе при 260 и 320 нм. Расчёт концентрации проводился при помощи онлайн-протокола http://www.molbiol.edu.ru/protocol/10_01.html

Обработка ДНК бисульфитом натрия. Конверсия ДНК проводилась в три этапа с использованием бисульфита натрия в качестве основного модифицирующего агента [9]. На первом этапе 2 мкг ДНК денатурировали (инкубация при 55°C в присутствии 0.3М NaOH), после чего модифицировали путём добавления 500 мкл смеси 4 М раствора NaHSO₃ и 0.2 М гидрохинона с последующей инкубацией в темноте при 55°C в течение 4 часов. На третьем этапе происходила очистка модифицированной ДНК от бисульфита натрия путем сорбции на тонкодисперсной двуокиси кремния (SiO₂).

Экстракция ДНК из твёрдофазных носителей широко используется в изготовлении коммерческих наборов для выделения и очистки нуклеиновых кислот [10-12]. Принципиальной основой применения в качестве сорбента диоксида кремния является способность селективного связывания положительно заряженного SiO₂ с молекулами отрицательно заряженной ДНК. Адсорбция, зависящая от значения pH, резко уменьшалась при pH > 7.5. Связанную с носителем ДНК отмывают от различных примесей, после чего элюируют в любом низкосолевоом буфере, но важно, чтобы pH был в районе 7.0-8.5 [12-13]. Необходимым условием является прогрев ДНК, сорбированной на носителе, особенно, если ДНК имеет достаточно большой размер (>5kbp). Преимуществом использования SiO₂ в качестве твёрдофазного носителя является то,

что частицы диоксида кремния слабо связывают ДНК в слабосолевых растворах (менее, чем 3М), поэтому случайное попадание сорбента в ПЦР-смесь не препятствовало амплификации.

В связи с вышеперечисленным, при разработке метода очистки ДНК, конвертированной бисульфитом натрия от солей, выбор был остановлен на использовании в качестве сорбента диоксида кремния.

Приготовление сорбента на основе двуокиси кремния. В стеклянном стакане в течение двух часов суспензировали 5 г SiO₂ (Sigma Aldrich) в 50 см³ HCl, непрерывно перемешивая, после чего трижды промывали в 50 см³ смеси метанола и соляной кислоты в соотношении 1:1, непрерывно перемешивая. Затем, в течение 3 минут отмывали диоксид кремния от кислоты в 100 см³ воды. Оставляли на 20 минут, после чего отбирали надосадочную жидкость. Стадию отмывки повторяли пять раз. Переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 5000 g в течение 3 минут. Добавляли 1.5 объёма воды и перемешивали. Готовый сорбент использовали для очистки ДНК.

Очистка модифицированной ДНК. К полученным образцам модифицированной ДНК добавляли 15 мкл суспензии SiO₂, после чего тщательно перемешивали в течение 1-2 минут. Далее, к раствору приливали 2.5 объёма изопропанола и снова тщательно перемешивали. Суспензию центрифугировали при 5000 g в течение 7 минут. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок промывали путём добавления 600 мкл 96% этанола с последующим центрифугированием в течение 1 минуты. Надосадочную жидкость удаляли и повторяли промывку 96% этанолом еще раз. Осадок промывали 80% этанолом, высушивали с открытой крышкой в течении 5-7 минут при 37°C. ДНК с частиц диоксида кремния элюировали водой.

Таблица 1. Праймеры для метил-специфичной ПЦР к гену *GDH2*

Table 1. Primers for methyl-specific PCR to the *GDH2* gene

Ген	Название	Положение цитозина		Последовательность	Размер ампликона, п.н.
<i>GDH2</i>	Прямой М	1	-304	AGATAAGTTAGTTATGG-GATGGGC	175
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAAC-GAA	
	Прямой U			AGATAAGTTAGTTATGG-GATGGGTG	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAAC-CAAACAAA	
	Прямой М	2	-263	GGTAAGTGGACGGAAAAGGA	203
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAAC-GAA	
	Прямой U			GGTAAGTGGATGGAAAAGGA	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAAC-CAAACAAA	
	Прямой М	3	-185	GGTTCGGTTTAGTTTTGAAA-TAAT	275
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAAC-GAA	
	Прямой U			GGTTCGGTTTAGTTTTGAAA-TAAT	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAAC-CAAACAAA	

Десульфонирование модифицированной ДНК осуществляли путем инкубации с 0.3 М NaOH в течение 20 минут при 37°C. Для осаждения ДНК из раствора добавляли 2 мкл раствора гликогена в концентрации 20 мг/см³, 35 мкл, 10М ацетата аммония и 3 объема 80% этанола, после чего инкубировали не менее 20 минут при -20°C. Затем, центрифугировали в течение 30 минут при 13 000 g, дважды промывали охлажденным 80% этанолом, высушивали и растворяли в воде, свободной от ДНКаз.

Обсуждение результатов

Качественный анализ обработанной ДНК при проведении электрофореза в 1% агарозном геле позволил обнаружить присутствие модифицированной ДНК на электрофореграмме (Рис. 2Б). Количественный анализ ДНК после четырех стадий бисульфитной обработки проводился спектрофотометрически на приборе Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific,

США) в 0.09% растворе при 260 и 320 нм. Установлено, что концентрация ДНК в обработанных бисульфитом образцах составляла 1 мкг. Потери ДНК в процессе всех манипуляций – 33.3%.

Для проверки пригодности полученной ДНК для анализа метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов проводили метил-специфичную ПЦР с использованием праймеров к гену *GDH2* глутаматдегидрогеназы кукурузы (таблица 1) с применением ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва). Амплификацию осуществляли на приборе Mini AMP Thermal cycler (Thermo Fisher, США) по схеме: предварительная денатурация (10 минут, 95°C), собственно амплификация (35 циклов), финальная элонгация (10 минут, 72°C). В ходе 35 циклов амплификации проводили денатурацию (30 сек, 95°C), амплификацию (30 сек, 53°C), элонгацию (30 сек, 72°C) [14].

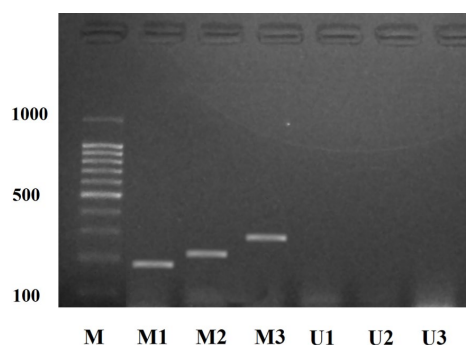


Рис. 3 Электрофореграмма ампликонов МС-ПЦР с матрицей модифицированной ДНК. М- маркер, М1- ампликон с праймерами М1 к гену GDH2; М2- ампликон с праймерами М2 к гену GDH2; М3- ампликон с праймерами М3 к гену GDH2; U1-ампликон с праймерами U1 к гену GDH2; U2- ампликон с праймерами U2 к гену GDH2; U3-ампликон с праймерами U3 к гену GDH2

Fig. 3 Electropherogram of MS-PCR amplicons with a modified DNA template. M - marker, M1 - amplicon with primers M1 to the GDH2 gene; M2 - amplicon with primers M2 to the GDH2 gene; M3 - amplicon with primers M3 to the GDH2 gene; U1 - amplicon with primers U1 to the GDH2 gene; U2 - amplicon with primers U2 to the GDH2 gene; U3 - amplicon with primers U3 to the GDH2 gene

Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия при силе тока 50-100 мА, напряжении электрического поля 140В, длительность разделения фрагментов ДНК – 30 минут [6-8]. Для визуализации использовали трансиллюминатор Serva Blue cube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) с длиной волны 312 нм.

Полученные ПЦР продукты соответствовали теоретическому размеру: 175 п.н., 203 п.н. и 275 п.н., соответственно, что указывает на то, что амплификация прошла успешно и очищенная ДНК пригодна к использованию в исследованиях анализа степени метилирования методом метил-специфичной ПЦР (рис. 3).

Заключение

Список литературы

1. Ashapkin V.V., Kutueva L. I., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21., no 20. P. 7457.
2. Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: past, present

and future // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2011. Vol. 1809, no 8. P. 360-368.- 3. Кирнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования // *Биохимия*. 1981. Т. 46, №. 12. С. 1458-1474.

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. Смирнихина С.А., Лавров А.В. Методы оценки метилирования остатков цитозина в ДНК // *Молекулярная биология*. 2009. Т. 43, №. 3. С. 387-391.

5. Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // *Биотехнология. Теория и практика*. 2012. №. 2. С. 9-26.

6. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та. 2008. 63 с.

7. Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б., Беланова Н.А., Назарова А.А. Фосфолипиды на фоне природных матриц. Воронеж: Научная книга. 2020. 318 с.

8. Селеменев В. Ф., Рудаков О. Б., Славинская Г.В., Дроздова Н.В. Пигменты пищевых производств (Меланоидины). М: Дели принт. 2008. 246 с.

9. Hsieh C. L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation // *Molecular and cellular biology*. 1999. Vol. 19, no 1. P. 46-56.

10. Katevatis C., Fan A., Klapperich C.M. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, no 5. P. 1-14.

11. Патент № 2129614 С1 Российская Федерация, МПК С12Р 21/06, А23J 1/18, С07Н 21/00. Способ получения нуклеиновых кислот и аминокислот из автолизатов пекарских дрожжей : № 93032352/13 : заявл. 21.06.1993 : опубл. 27.04.1999 / В. Ф. Селеменев, Г. Ю. Орос, И. В. Руденко [и др.]. – EDN BOJYOI.

12. Rimola A., Costa D., Sodupe M., Lambert J.F., Ugliengo P. Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. // *Chemical Reviews*. 2013. Vol. 113, no 6. P. 4216-4313.

13. Poeskh T., Lopez S., Fuller A.O., Solomon M.J., Larson R. G. Adsorption and elution characteristics of nucleic acids on silica surfaces and their use in designing a miniaturized purification unit // *Analytical Biochemistry*. 2008. Vol. 373, no 2. P. 253-262.

14. Kramer M.F., Coen D. M. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization // *Current Protocols in Molecular Biology*. 2011. CHAPTER: Unit15.10.

References

1. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(20): 7457.

2. Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2011; 1809(8): 360-368.

3. Kirnos M.D., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования. *Biochemistry*. 1981; 46(12): 1458-1474.

4. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Методы оценки метилирования остатков цитозина в ДНК. *Молекулярная биология*. 2009; 43(3): 387-391.

5. Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. Специфика выделения ДНК из растительных объектов. *Биотехнология. Теория и практика*. 2012; 2: 9-26. (In Russ.)

6. Eprintsev A.T., Popov V.N., Fedorin D.N. Идентификация и исследование экспрессии генов. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2008. 63 с. (In Russ.)

7. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A. Фосфолипиды на фоне природных матриц. Воронеж: Science Book. 2020. 318 с. (In Russ.)

8. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaya G.V., Drozdova N.V. Пигменты пищевых производств (Меланоидины). М: Delhi Print. 2008. 246 с. (In Russ.)

9. Hsieh C.L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation. *Molecular and cellular biology*. 1999; 19(1): 46-56.



10. Katevatis C., Fan A., Klapperich C.M. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PLoS One*. 2017; 12(5): 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>
11. Selemenev V.F., Oros G.Yu., Rudenko I.V., Stukalov O.I., Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Sposob polucheniya nukleinykh kislot i aminokislot iz avtolizatov pekarskikh drozhzhei. 1999.
12. Rimola A., Costa D., Sodupe M., Lambert J.F., Ugliengo P. Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. *Chemical Reviews*. 2013; 113(6): 4216-4313. <https://doi.org/10.1021/cr3003054>
13. Poeckh T., Lopez S., Fuller A.O., Solomon M.J., Larson R.G. Adsorption and elution characteristics of nucleic acids on silica surfaces and their use in designing a miniaturized purification unit. *Analytical Biochemistry*. 2008; 373(2): 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.026>
14. Kramer M.F., Coen D.M. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2011; CHAPTER: Unit15.10.

Информация об авторах / Information about the authors

Г.Б. Анохина – ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки, м.н.с., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Ю. Селиванов – студент кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.С. Грязев – студент кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Т. Епринцев – профессор кафедры биохимии и физиологии клетки, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

О.Е. Чухлебова – студент, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

G.B. Anokhina – assistant of Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: Dowi2009@mail.ru

A.Yu. Selivanov – student of Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

A.S. Gryazev – student of Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

A.T. Eprintsev – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

O.E. Chukhlebova – student of Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 30.12.2022; одобрена после рецензирования 14.02.2023; принята к публикации 15.02.2023.

The article was submitted 30.12.2022; approved after reviewing 14.02.2023; accepted for publication 15.02.2023.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11153

Идентификация электрофоретическим способом продуктов рестрикционного анализа по сайту GATC геномной ДНК пшеницы при солевом стрессе

Дмитрий Николаевич Федорин¹,

Виктория Олеговна Чуйкова¹, Александр Трофимович Епринцев^{1✉}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru✉

Аннотация. Современные методы исследования нуклеиновых кислот показали наличие в составе ДНК модифицированных азотистых оснований, главным образом, в виде их метилирования. Несмотря на то, что за последние несколько десятилетий было проделано много работы по выяснению роли 5-метилцитозина, только в последнее время было признано, что N(6)-метиладенин (^{6m}A) - N6-метиладенин присутствует в количественных и биологически активных уровнях в ДНК эукариотических клеток. Установлено, что содержание ^{6m}A может варьировать более чем на порядок в пределах изогенной популяции организмов и уровни ^{6m}A у этих организмов могут быть особенно чувствительны к незначительным изменениям в окружающей среде, например, к стрессовым факторам. Метилспецифичная рестрикция эндонуклеазой Mal I позволила выявить изменение аденилатного метильного статуса ДНК клеток листьев пшеницы в условиях солевого стресса. Это рестрицирующий фермент, распознающий метилированный аденин в составе последовательности нуклеотидов GATC и осуществляющий симметричную рестрикцию по данному сайту. Применение гуанидин-изотиоцианатной экстракции позволило выделить общую ДНК из клеток листьев пшеницы практически без следов деградации, что является необходимым условием для дальнейших аналитических исследований. Использование электрофоретического метода, обеспечивающего разделение фрагментов рестрикции на основе их заряда и размера, позволило оценить метильное состояние исследуемой последовательности ДНК листьев пшеницы в разных экспериментальных условиях. Анализ результатов рестрикционного анализа образцов ДНК пшеницы в разные часы засоления указывает, что в исследуемых образцах значительно меняется характер распределения продуктов рестрикции на основе их размера, что свидетельствует об изменении метильного статуса аденина в составе сайта GATC. Результаты денситометрии свидетельствуют об увеличении продуктов рестрикции по анализируемым сайтам. Относительно контрольного варианта, где обнаружены, в основном, высокомолекулярные рестрикционные фрагменты, на 24 час инкубации растений в растворе хлорида натрия основная доля продуктов рестрикции эндонуклеазой Mal I приходилась на низкомолекулярные. Увеличение продуктов рестрикции геномной ДНК пшеницы на 24 час эксперимента свидетельствует о большем количестве метилированного аденина в составе сайта GATC в данный период эксперимента. Изменение характера распределения метилирования аденина может являться регуляторным механизмом контроля адаптивной реакции клеточного метаболизма листьев пшеницы на уровне экспрессионной активности соответствующих генов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, рестрикция, аденин, метилирование ДНК, солевой стресс.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

Для цитирования: Федорин Д.Н., Чуйкова В.О., Епринцев А.Т. Идентификация электрофоретическим способом продуктов рестрикционного анализа по сайту GATC геномной ДНК пшеницы при солевом стрессе // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 2. С. 299-306. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11153>



Original article

Electrophoretic identification of restriction analysis products at the GATC site of wheat genomic DNA under salt stress

Dmitry N. Fedorin¹, Victoria O. Chuikova¹, Alexander T. Eprintsev¹✉

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru✉

Abstract. Modern methods for the study of nucleic acids have shown the presence of modified nitrogenous bases in DNA, mainly, in the methylated form. Although many study were performed over the past few decades to elucidate the role of 5-methylcytosine, it has only recently been recognized that N(6)-methyladenine (6mA) - N6-methyladenine is present in quantitative and biologically active levels in the DNA of eukaryotic cells. It was established that 6mA content can vary by more than an order of magnitude within an isogenic population of organisms and 6mA levels in these organisms can be particularly sensitive to minor changes in the environment, for example, to stress factors. Methyl-specific restriction using Mal I endonuclease allowed to reveal changes in the adenylate methyl status of DNA in leaf cells of wheat under salt stress. This is a restriction enzyme that recognizes methylated adenine in the GATC nucleotide sequence and performs a symmetrical restriction at this site. The use of guanidine-isothiocyanate extraction allowed to isolate total DNA from leaf cells of wheat with virtually no signs of degradation, which is a necessary condition for further analytical studies. The use of the electrophoretic method, which ensures the separation of restriction fragments based on their charge and size, allowed to estimate the methyl state of the studied wheat leaf DNA sequence under different experimental conditions. Analysis of the results of restriction analysis of wheat DNA samples at different hours of salinity indicated that the distribution of restriction products based on their size significantly changes in the studied samples, which indicated a change in the methyl status of adenine in the GATC site. The results of densitometry indicate an increase in restriction products at the analysed sites. In comparison with the control variant, where mainly high molecular weight restriction fragments were found, at 24 h of incubation of plants in sodium chloride solution, the main share of products obtained by restriction with Mal I endonuclease was presented by low molecular weight fragments. An increase in wheat genomic DNA restriction products at the 24th hour of the experiment indicates a higher amount of methylated adenine in the GATC site during this period of the experiment. The changed in the distribution of adenine methylation may be a regulatory mechanism for the control of the adaptive response of cell metabolism in wheat leaves at the expression level of the corresponding genes.

Keywords: *Triticum aestivum*, restriction, adenine, DNA methylation, salt stress.

Acknowledgments: this work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state order for universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project no. FZGU-2023-0009

For citation: Fedorin D.N., Chuikova V.O., Eprintsev A.T. Electrophoretic identification of restriction analysis products at the GATC site of wheat genomic DNA under salt stress. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 299-306. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11153>

Введение

Солевой стресс, как важный фактор в исследовании адаптивной реакции растений, исследуется на уровне ферментативных систем [1, 2]. Одним из основных механизмов адаптации растений к высокому содержанию солей является ограничение поступления Na^+ в особо чувствительные к засолению ткани. Для осуществления данного механизма важное значение играют цитоплазма и вакуоль,

которые обеспечивают осмотический баланс в том числе за счет дополнительного биосинтеза осмолитов и накопления ионов калия. Биосинтетические процессы, направленные на адаптацию к засолению, требуют притока энергии, необходимой для координации углеводного и азотного обмена [3]. Полученные ранее данные свидетельствуют, что солевой стресс вызывает изменение содержания мРНК генов ряда изоферментов, что коррелирует с их ферментативной активностью в данных условиях. При этом,

между метильным статусом промоторов генов, в составе которых обнаружены CpG-островки, и уровнем их транскриптов наблюдается зависимость [4, 5]. Несмотря на то, что за последние несколько десятилетий было проделано много работы по выяснению роли 5-метилцитозина, только в последнее время было признано, что N6-метиладенин (^{6m}A) присутствует в количественных и биологически активных уровнях в ДНК эукариотических клеток. Несколько исследований показали, что метилирование N6-аденина коррелирует с повышенной экспрессией генов [6]. Анализ кристаллической структуры ДНК показал, что ^{6m}A может изменить ее вторичную структуру за счет изменения как стабильности пары оснований, так и укладки оснований [7], что напрямую отражается в характере взаимодействия с факторами транскрипции.

Относительно немного данных имеется о функциональной важности ДНК-^{6m}A в геномах эукариотических организмов, в том числе и о роли ^{6m}A в динамической регуляции биологических процессов [8, 9]. Предполагается, что уровни ^{6m}A у эукариот могут быть особенно чувствительны к незначительным изменениям в окружающей среде, например, к стрессовым факторам [6, 10]. В частности, установлена светозависимость скорости функционирования аденин-ДНК-метилтрансфераз, что находит свое отражение в увеличении числа метилированных аденинов в сайтах GATC. Появление в клетке активной формы фитохрома при облучении красным светом вызывает увеличение доли метилированных аденинов в промоторе гена цитратсинтазы. Механизмом регуляции в данном случае является контроль экспрессии гена *nbamt1* [11]. Целью данного исследования являлось изучение изменения аденилатного метильного статуса ДНК по сайтам GATC в листьях пшеницы в условиях засоления 150 мМ хлоридом натрия.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования были использованы листья 14-дневной пшеницы (*Triticum aestivum* L.), которая была выращена гидропонным способом при дневном 12 часовом световом дне с интенсивностью света 90 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ при температуре окружающей среды 25°C.

Постановка эксперимента по действию солевого стресса осуществлялась путём помещения растений из опытной группы, с предварительно удаленной корневой системой, в 150 мМ водный раствор хлорида натрия (NaCl) на 24 часа. В качестве контрольной группы использовались растения, помещённые в воду на 24 часа. У данной группы корневая система также предварительно удалялась. Образцы для исследования отбирались через 6, 12 и 24 часа от начала эксперимента.

Геномную ДНК из листьев пшеницы выделяли методом фазового распределения, основанном на фенол-хлороформной экстракции. Специфическим осадителем в нашей работе выступал ацетат аммония [12].

Для обнаружения метилированного статуса геномной ДНК по аденину использовали фермент Mal 1 (SibEnzyme, Россия). Картину специфического гидролиза геномной ДНК из листьев пшеницы в условиях различного светового режима определяли методом ограниченного рестрикционного анализа (расщепление молекулы ДНК по специфическим сайтам) при обработке 2 мкг ДНК, при помощи 1 единицы фермента в течение 4 часов при 37°C [13].

Качественный анализ ДНК проводили путем электрофоретического исследования в геле 1% агарозы в течение 40 мин при напряжении 60 В. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот осуществляли в электродном (ТАЕ) буфере: 200 мМ Трис, 100 мМ уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА, рН 8.4. Красителем

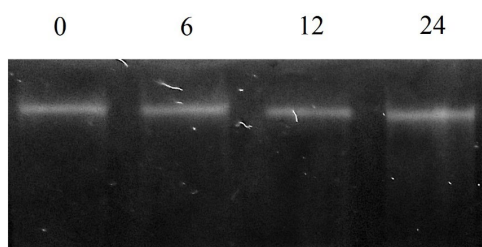


Рис. 1. Геномная ДНК из листьев пшеницы в условиях засоления. 0 – растения, экспонируемые в стандартных условиях (контроль), 6 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 6 часов, 12 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 12 часов, 24 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 24 часов.

Fig. 1. Genomic DNA from wheat leaves under salt stress conditions. 0 – plants incubated under standard conditions (control), 6 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 6 hours, 12 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 12 hours, 24 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 24 hours.

выступал бромистый этидий, являющийся интеркалирующим и флуоресцирующим при встраивании в молекулу нуклеиновой кислоты.

Денситометрический анализ гелей осуществляли с применением программного обеспечения GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com).

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. Данные были подвергнуты двустороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием программного обеспечения для анализа данных STATISTICA версии 9 ((Statsoft Wipro, East Brunswick, NJ, USA). Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (SD). Обсуждаются статистически значимые различия при $p < 0.05$ [14].

Обсуждение результатов

Для оценки метильного статуса геномной ДНК листьев пшеницы в условиях засоления 150 мМ хлоридом натрия из исследуемых образцов была выделена геномная ДНК с использованием метода гуанидин-изотиоцианатной экстракции без

следов деградации, что является необходимым условием для дальнейшего проведения аналитических исследований (рис. 1).

Для анализа метильного статуса аденина (по сайту GATC) в составе ДНК был применен метод рестрикционного анализа с использованием эндонуклеазы *Mal* 1, обеспечивающий симметричное расщепление ДНК по сайту $G^{m^6}A^T C$, в составе которого аденин метилирован [15].

Полученные результаты метилспецифичной рестрикции с применением эндонуклеазы *Mal* 1 свидетельствуют об изменении метильного статуса ДНК клеток листьев пшеницы в условиях солевого стресса. При воздействии хлорида натрия на растения в геноме ДНК исследуемых растений наблюдается существенное отличие в количестве продуктов рестрикционного анализа, что находит отражение в изменении числа рестрикционных фрагментов на агарозном геле после электрофоретического разделения. Агарозный гель позволяет эффективно разделить продукты рестрикции на основании их размера. Величина отрицательного заряда нуклеиновой кислоты слабо зависит от pH раствора, вследствие чего разделение на фракции происходит в основном за счет различия в линейных размерах молекул [16].

Установлено, что значительно меняется характер распределения метилированного аденина в составе GATC сайтов.

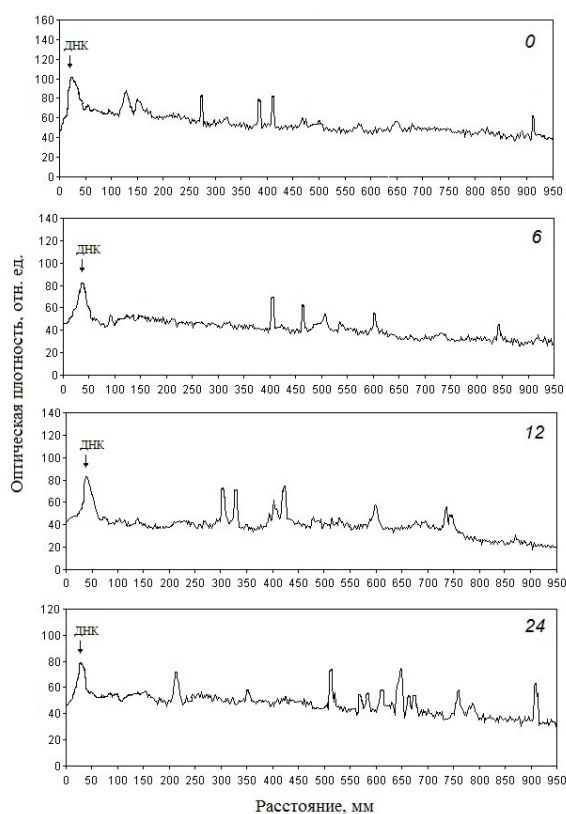


Рис. 2. Денситограмма образцов геномной ДНК пшеницы при солевом стрессе, подвергшихся рестрикции эндонуклеазой Mal 1. ДНК – геномная ДНК из листьев пшеницы. 0 – растения, экспонируемые в стандартных условиях (контроль), 6 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 6 часов, 12 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 12 часов, 24 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 24 часов.

Figure 2. Densitogram of wheat genomic DNA samples under salt stress subjected to restriction with Mal 1 endonuclease. DNA - genomic DNA from wheat leaves. 0 – plants incubated under standard conditions (control), 6 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 6 hours, 12 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 12 hours, 24 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 24 hours.

Об этом свидетельствуют результаты рестрикционного анализа, в ходе которого установлено изменение в размерах продуктов специфического гидролиза по сайтам GATC. Следовательно, изменение паттерна метилирования аденина носит солезависимый характер. При денситометрическом анализе результатов электрофоретического разделения продуктов специфического рестрикционного анализа геномной ДНК пшеницы по сайтам GATC в разные часы засоления наблюдается изменение профиля метилирования анализируемой ДНК по аденину. Результаты денситометрии свидетельствуют об увеличении продуктов рестрикции по

анализируемым сайтам (рис. 2). Относительно контрольного варианта, где обнаружены, в основном, высокомолекулярные рестрикционные фрагменты, на 24 час инкубации растений в растворе хлорида натрия основная доля продуктов рестрикции эндонуклеазой Mal 1 приходилась на низкомолекулярные. Следовательно, к 24 часу солевого стресса в растениях пшеницы увеличился адениновый метильный статус геномной ДНК.

Анализ результатов рестрикционного анализа образцов ДНК пшеницы в разные часы засоления указывает, что в исследуемых образцах значительно меняется ха-

Таблица 1. Распределение продуктов рестрикции геномной ДНК пшеницы эндонуклеазой Mal 1 при засолении

Table 1. Distribution of restriction products of wheat genomic DNA by Mal 1 endonuclease under salt stress

Расстояние от стартовой точки, мм	Время экспозиции в 150 мМ растворе хлорида натрия, час			
	0	6	12	24
125	+			
150	+			
210				+
270	+			
300			+	
330			+	
350				+
370	+			
400			+	
410	+	+		
420			+	
460		+		
500		+		
510				+
530		+		
560				+
570				+
600		+	+	
610				+
650				+
660				+
670				+
740			+	
750			+	
760				+
780				+
850		+		
910	+			+

рактически равномерное распределение продуктов рестрикции, пройденное ими расстояние при электрофоретическом разделении в 1% агарозном геле от стартовой точки, что свидетельствует об изменении метильного статуса аденина в составе сайта GATC (табл. 1). Показано, что для контрольных растений (0 часов) характерно наличие крупных продуктов рестрикции, о чем свидетельствуют фрагменты, прошедшие расстояние от 125 до 410 мм в гелевой пластинке. На 6 и 12 час экспозиции растений в 150 мМ растворе хлорида натрия наблюдается изменение размера рестрикционных фрагментов, которые имеют меньший размер по сравнению с

рестрикционными фрагментами контрольных растений. В этих образцах рестрикционные фрагменты располагались в пределах от 300 до 750 мм от стартовой точки на геле.

К 24 часу экспозиции растений пшеницы в 150 мМ растворе хлорида натрия обнаружено максимальное количество продуктов рестрикции по сайту GATC, которое составляет 12. Увеличение продуктов рестрикции геномной ДНК пшеницы на 24 час эксперимента свидетельствует о большем количестве метилированного аденина в составе сайта GATC в данный период эксперимента. При этом основное количество рестрикционных фрагментов имеет небольшой размер, что



отражается в пройденном ими расстоянии от начала геля. 10 из 12 продуктов рестрикции находились в пределах от 510 до 910 мм от стартовой точки на гелевой пластинке.

Заключение

Проведенные исследования по метил-специфичной рестрикции геномной ДНК пшеницы с применением эндонуклеазы Mal 1 свидетельствуют об изменении ее метильного статуса в условиях солевого стресса. Изменение количества продуктов рестрикции указывает на различие в метильном статусе ДНК пшеницы в зависимости от времени действия солевого стресса на растения. Увеличение количества продуктов рестрикции к 24 часу экспозиции растений в 150 мМ растворе хлорида натрия указывает на увеличение количества метилированного аденина в сайтах GATC, специфически гидролизующихся эндонуклеазой Mal 1.

Список литературы/References

1. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K., Bohnert H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2000; 51: 463-499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
2. Bajji M., Kinet J.-M., Lutts S. Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Canadian Journal of Botany*. 2002; 80: 297-304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/b02-008>
3. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: 1042. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01042>
4. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Anokhina G.B., Igamberdiev A.U. Effects of light, anoxia and salinity on the expression

Следовательно, изменение паттерна метилирования аденина носит солезависимый характер. По мере развития адаптивной реакции клеточного метаболизма на засоление в клетках листьев пшеницы увеличивается метильный статус геномной ДНК по аденину, что обусловлено активацией аденин-ДНК-метилтрансферазой. Метилирование N6-аденина вызывает увеличение экспрессионной активности генов [6], в том числе и генов, ответственных за синтез осмолитов, что может выступать механизмом адаптации к действию стрессового фактора.

Конфликт интересов

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

of dihydroxyacid dehydratase in maize. *Journal of Plant Physiology*. 2021; 265: 153507.

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153507>

5. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U. Effect of Salt Stress on the Expression and Promoter Methylation of the Genes Encoding the Mitochondrial and Cytosolic Forms of Aconitase and Fumarase in Maize. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 6012. <https://doi.org/10.3390/ijms22116012>

6. Rogers J.C., Rogers S.W. Comparison of the effects of N6-methyldeoxyadenosine and N5-methyldeoxycytosine on transcription from nuclear gene promoters in barley. *Plant Journal*. 1995; 7: 221-233. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1995.7020221.x>

7. O'Brown Z.K., Greer E.L. N6-methyladenine: a conserved and dynamic DNA mark. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 945: 213-246. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_10



8. Fu Y., Luo G-Z., Chen K., Deng X., Yu M., Han D., Hao Z., Liu J., Lu X., Dore L.C., Weng X., Ji Q., Mets L., He C. N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell*. 2015; 161: 879-892. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.010>
9. Jia G., Fu Y., Zhao X., Dai Q., Zheng G., Yang Y., Yi C., Lindahl T., Pan T., Yang Y-G., He C. N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*. 2011; 7: 885-887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
10. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2012; 13: 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
11. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U. Light Dependent Changes in Adenylate Methylation of the Promoter of the Mitochondrial Citrate Synthase Gene in Maize (*Zea mays* L.) Leaves. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23: 13495. <https://doi.org/10.3390/ijms232113495>
12. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*. 2019; 36: 116-117. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
13. Siwek W., Czapinska H., Bochtler M., Bujnicki J.M., Skowronek K. Crystal structure and mechanism of action of the N6-methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease R. DpnI. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 7563-7572. <https://doi.org/10.1093/nar/gks428>
14. Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher school, 1990. 351p. (In Russ.)
15. Lacks S., Greenberg B. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975; 250: 4060-4066.
16. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaya G.V., Drozdova N.V. Pigmenty pishchevyh proizvodstv (melanoidiny). M: Delhi print. 2008. 246 p. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Д.Н. Федорин – доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, доцент, к.б.н., 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, д.б.н., 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. Chuykova – 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 06.02.2023; одобрена после рецензирования 11.04.2023; принята к публикации 19.04.2023.

The article was submitted 06.02.2023; approved after reviewing 11.04.2023; accepted for publication 19.04.2023.

Памяти профессора В.Н. Попова



Смерть Попова Василия Николаевича 13 апреля 2023 года поразила всех внезапно. Василий Николаевич более 25 лет проработал в Воронежском государственном университете, в последнее время заведующим кафедрой и проректором по научной работе, а с 2019 года был назначен ректором Воронежского государственного университета инженерных технологий.

Василий Николаевич успешно закончил школу № 73 г. Воронежа с золотой медалью и после поступления на биолого-почвенный факультет в 1991 году специализировался по кафедре биохимии и физиологии клетки. Его целеустремленная учеба позволила успешно закончить университет экстерном за 4 года. В течение двух лет выполнил и успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Особенности организации и ферментативной регуляции метаболизма сукцината» (1997), в которой было пока-

зано, что интенсификация метаболизма сукцината связана с работой глиоксилатного цикла как в растительных, так и в животных тканях. За проведенные исследования был удостоен премии Европейской Академии для молодых учёных из стран СНГ и Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники для молодых учёных. Являлся стипендиатом Федерации европейских биохимических обществ и стипендиатом Фонда Александра фон Гумбольдта.

В 2001 году работал приглашенным профессором в Университете города Кампинас, Бразилия. В следующем году занимал должность стажера-исследователя по программе INTAS в Свободном университете города Амстердам, где освоил современные методы исследований по молекулярной биологии, идентификации и экспрессии генов. Вернувшись в Россию, активно работал в научных лабораториях кафедры биохимии и физиологии клетки. Научные исследования Василия Николаевича были связаны с выяснением важнейших вопросов ферментативной и молекулярной регуляции метаболизма. Докторская диссертация на тему: «Роль процессов свободного окисления дыхательных субстратов в метаболизации жирных кислот и защите от активных форм кислорода» успешно была защищена в 2003 году. Было показано, что нейтральные липиды являются основной запасной формой органического вещества, и от возможности их быстрой утилизации зависит скорость адаптации организма. Причем β -окисление жирных кислот может протекать как в митохондриях, обеспечивая энергетические потребности клетки, так и в пероксисомах.

Василий Николаевич был великолепным педагогом и читал лекции по биохимии, молекулярной биологии, биоэнергетике и другим курсам. Особенно студентам нравились его увлекательные лекции по биохимии. Под его руководством были защищены более 15 кандидатских диссертаций и 1 докторская работа. Проходил стажировку по программе CRDF-Фонда Владимира Потанина в Университете штата Юта по управлению научными исследованиями.

С 2006 года Василий Николаевич являлся президентом Российского союза молодых ученых. Был приглашенным редактором специального выпуска журнала



Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. С 2007 года занимал должность заместителя председателя Координационного Совета по делам молодежи в научно-образовательной сфере при Совете по науке, образованию и технологиям при Президенте РФ.

Василий Николаевич Попов в 2008 году возглавил кафедру генетики, цитологии и биоинженерии, где продолжил изучение сопряженного и несопряженного митохондриального дыхания на разных модельных объектах. Сначала это были сугубо биоэнергетические исследования на изолированных митохондриях шмелей и мышей. Но позже к биохимическим методам добавились и молекулярно-генетические, например измерение экспрессии генов, оценка целостности мтДНК с помощью полимеразной цепной реакции и, конечно же, секвенирование нуклеотидов. Толчком к развитию данного направления, безусловно, стала статья, опубликованная в журнале Nature в 2016 году, где были описаны новые подходы к созданию библиотек для секвенирования на платформе Ion Torrent. Изначально секвенирование применялось для оценки мутационного профиля пациентов с онкологическими заболеваниями. Так были охарактеризованы мутационные профили пациентов с раком груди и раком почки. Позже секвенирование было использовано для оценки бактериального состава кишечного микробиома мышей и человека при различных патологических состояниях. Василий Николаевич нашел применение молекулярно-генетических методов и в агробιοтехнологиях. Были разработаны способы и подходы для идентификации сельскохозяйственных вредителей и энтомофагов.

За время работы на кафедре генетики, цитологии и биоинженерии Василий Николаевич не только привнес классическую биохимию, но развил генетические направления на уровне мировых лабораторий. В 2018 году это нашло общественное признание, когда коллективу исследователей кафедры был присвоен статус ведущей научной школы Советом по грантам Президента Российской Федерации.

В 2018 году избран профессором Российской академии наук.

С 2019 года Василий Николаевич возглавил Воронежский государственный университет инженерных технологий, при этом продолжал работать на кафедре генетики, цитологии и биоинженерии.

За четырехлетний период работы ему удалось многое сделать. Сплотить коллектив, создать лабораторию метагеномики и пищевых биотехнологий. На новом месте он также активно включился в работу, связанную с пищевой промышленностью, но только уже с багажом опыта молекулярно-генетических методов. Разработаны способы секвенирования кисломолочных и мясных продуктов питания с целью корректной идентификации бактерий, и оценки обсеменения продукции эукариотическими микроорганизмами, например дрожжами и плесенью.

Василий Николаевич публиковал научные материалы в высокорейтинговых журналах с высоким индексом цитирования, первого квартиля.

Светлая Вам память, дорогой Василий Николаевич!

А.Т. Епринцев, В.А. Агафонов

Памяти профессора В.Н. Майстренко



17 мая 2023 безвременно скончался заведующий кафедрой аналитической химии Уфимского университета науки и технологий, (бывший Башкирский государственный университет), доктор химических наук, профессор Валерий Николаевич Майстренко. Талантливый учёный, блестящий организатор и прекрасный человек, всей душой преданный аналитической химии.

Валерий Николаевич родился в п. Новиковка Аургазинского района Башкирской АССР, и в 1970 г. закончил химический факультет Башкирского госуниверситета. Дальше было поступление в аспирантуру при Казанском университете, служба в Вооружённых силах и защита в 1975 г. кандидатской диссертации.

После защиты Валерий Николаевич принял решение вернуться домой, в родную Башкирию. С 1975 г. он работал в alma-mater на различных должностях. В 1990 г. защитил докторскую диссертацию. В 1990-1993 годах – декан химического факультета. В 1993 г. Валерий Николаевич был приглашён на работу в создаваемый НИИ безопасности жизнедеятельности на должность сначала заместителя директора по науке, а с 1996 года – директора. В это время в Республике Башкортостан, после аварии с выбросом фенола, остро стояла проблема создания программ экологического мониторинга состояния окружающей среды. Валерий Николаевич с нуля начал заниматься данной проблемой, и создал один из ведущих в России научных центров в области аналитической химии объектов окружающей среды, экологии и безопасности жизнедеятельности. В институте была организована одна из лучших в России лабораторий по контролю содержания диоксинов и стойких органических загрязнителей в объектах окружающей среды. Работая над проблемами экологии Башкортостана, Валерий Николаевич не забывал и про родной университет, работая на должности заведующего кафедрой неорганической химии.

В 2012 г. В.Н. Майстренко становится заведующим кафедрой аналитической химии. И снова Валерию Николаевичу пришлось начинать с нуля, поскольку в тот момент материальная база на кафедре почти отсутствовала. За 11 лет руководства кафедра аналитической химии полностью преобразилась. Создано новое направление в области вольтамперометрии – хиральные электрохимические сенсоры. На сегодняшний день единственные в стране специалисты в этой области работают в Уфе. В годы руководства кафедрой выиграно 8 грантов РФФИ, а также множество других конкурсов и грантов. Кафедра аналитической химии по уровню научной работы стала одной из ведущих во всём университете.

В.Н. Майстренко вёл активную общественную деятельность. Так, долгие годы он был активным членом Научного совета РАН по аналитической химии (НСАХ). В



последние годы Валерий Николаевич трудился председателем комиссии по электрохимии НСАХ и членом бюро совета. Также В.Н. Майстренко работал председателем Научного совета АН РБ по экологии и природопользованию и состоял в нескольких диссертационных советах. Долгие годы Валерий Николаевич являлся членом редколлегии «Журнала аналитической химии». Также он был избран член-корреспондентом Академии наук Республики Башкортостан.

В.Н. Майстренко был известен и как организатор более чем 10 Всероссийских конференций по проблемам аналитической химии объектов окружающей среды и электрохимического анализа. Его книги в области экологического мониторинга и электрохимического анализа стали золотым фондом российской науки. Валерий Николаевич был всемирно признанным специалистом в области электрохимических методов анализа и оставил после себя множество учеников и коллег, которым открыл путь в большую науку.

Уход Валерия Николаевича – невосполнимая утрата для российской аналитической химии. Светлая память о Валерии Николаевиче навсегда сохранится в наших сердцах.

Редакция журнала «Сорбционные и хроматографические процессы» вместе с коллективом кафедры аналитической химии Уфимского университета науки и технологий выражает глубокие соболезнования родным и близким Валерия Николаевича.

ХРОМАТОГРАФИЯ – ОБЛАСТЬ НАШЕЙ КОМПЕТЕНЦИИ

инновации, технологии, оборудование и расходные материалы

РАЗРАБАТЫВАЕМ:

- технологии очистки субстанций
- методы выделения и очистки примесей
- сорбенты для всех видов жидкостной хроматографии
- методы контроля безопасности и подлинности продуктов питания и кормов



ПРОИЗВОДИМ:

- сорбенты для хроматографии
- концентрирующие патроны «Диапак»
- аналитические ВЭЖХ-колонки «Диасфер» и «Наутилус»
- аналитические комплекты для экологического анализа и контроля подлинности и безопасности продуктов питания и кормов
- препаративные колонны динамического аксиального сжатия АХИОМА диаметром 100 и 200 мм для очистки субстанций методом ВЭЖХ
- стеклянные колонки аксиального сжатия диаметром от 24 до 450 мм, объемом до 50 л
- автоматизированные хроматографические комплексы низкого давления АХИОМА для очистки субстанций с потоками элюента до 1 литра в минуту

К нам обращаются фармацевтические компании и другие организации для разработки технологий очистки субстанций «под ключ» и наработки стандартных образцов или примесей субстанций, когда это сложно или невыгодно делать на собственном производстве. Мы изучаем и сравниваем существующие методы очистки, опираясь на 30-летний опыт работы, добиваемся целевых показателей, масштабируем результаты, подбираем оборудование и расходные материалы, обучаем персонал заказчика. Не занимаемся технологиями очистки в нормально-фазовом режиме с применением органических растворителей в качестве элюентов.

Рассматриваем работы как по выделению и очистке небольших количеств субстанций или примесей, так и технологии очистки промышленного масштаба. Внедрим технологию на вашем производстве, используя современные непрерывные технологии очистки и колонки большого диаметра, увеличим производительность, снизим риск ошибок, обеспечим устойчивость технологического процесса.



Biotage

ChromaCon

KNAUER

Kromasil

ПРЕДСТАВЛЯЕМ ПРОДУКЦИЮ:

- **Biotage AB (Швеция)** – пробоподготовка, органический и пептидный синтез
- **Chromacon (Швейцария)** – препаративные системы для непрерывной хроматографии
- **Knauder GmbH (Германия)** – препаративная и аналитическая хроматография
- **Nouryon (Швеция)** – сорбенты и колонки для хроматографии
- **A.I.T.France (Франция)** – оборудование для безопасной работы с растворителями

Увеличьте производительность пептидного и органического синтеза, используя микроволновые реакторы Initiator+. Для быстрой очистки полученных соединений используйте флеш-хроматографы Select. Высокоскоростные упариватели позволят вам получить готовое вещество из раствора за считанные минуты. Быстрота получения результатов, удобство работы и надежность оборудования – девиз компании Biotage.

Компания Chromacon с препаративной хроматографической системой Contichrom не имеет аналогов в мире. Она позволяет в непрерывном режиме MCSGP нарабатывать высокоочищенные субстанции, а в режиме N-Rich – примеси с производительностью и качеством, не достижимыми традиционными методами.

Препаративные хроматографические системы AZURA позволяют на одном приборе и разрабатывать, и масштабировать метод очистки за счет широкого диапазона скоростей потока и разнообразия используемых модулей в блоках Assistant.

Автоматизированное оборудование Biotage для подготовки проб позволит сделать рутинную работу легкой и займет совсем немного времени, а хроматографические сорбенты и ВЭЖХ-колонки Kromasil (Nouryon) незаменимы, если важна максимальная воспроизводимость от партии к партии как в контроле фармацевтических препаратов, так и в технологиях очистки.

Простое оборудование A.I.T.France обеспечит безопасную работу Вашего персонала с элюентами, содержащими токсические компоненты и растворители.

Цена свободная

*Подписка по каталогу «Почта России»,
подписной индекс ПН132*

*При перепечатке и цитировании
ссылка на «Сорбционные и хроматографические процессы»
обязательна*

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

*Авторы статей, опубликованных в данном журнале, декларируют отсутствие явных
и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией их статей*

Подписано в печать 5.05.2023. Формат 60×84 ½

Дата выхода в свет 02.06.2023

Усл. печ. л. 18,37. Тираж 250 экз. Заказ 85

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+