

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Научный журнал
Выходит 6 раз в год

Том 24, № 3, 2024

ISSN 1680-0613

УЧРЕДИТЕЛЬ:

ФГБОУ ВО «Воронежский
государственный университет»

Журнал основан в декабре 2000 г.

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

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

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

Индексируется:

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

При перепечатке ссылка на «Сорбционные и хроматографические процессы» обязательна

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

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

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

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

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

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

Ответственные секретари:

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

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



©Воронежский государственный университет, 2024

SORPTION AND CHROMATOGRAPHY PROCESSES

Scientific journal
Published 6 times per year

Volume 24, No 3, 2024

ISSN 1680-0613

FOUNDER:

Voronezh State University

Journal was founded in December 2000

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

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

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

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

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

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

EDITOR-IN-CHIEF:

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

DEPUTY-EDITORS-IN-CHIEF:

A.K. Buryak, Dr.Sc., Prof. (IPCE RAS, Moscow)

O.B. Rudakov, Dr.Sc., Prof. (VSTU, Voronezh)

EDITORIAL BOARD:

O.V. Bobreshova, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

E.V. Butyrskaya, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

V.I. Vasil'eva, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

A.M. Dolgonosov, Leading scientific researcher (GEOKHI RAS, Moscow)

V.I. Deineka, Dr.Sc., Prof., (Belgorod State National Research University, Belgorod)

A.N. Zyablov, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

T.V. Eliseeva, Ph.D. (Voronezh)

A.T. Eprintcev, Dr.Sc., Prof. (Voronezh)

V.A. Ivanov, Dr.Sc., Prof. (MSU, Moscow)

S.I. Karpov, Dr. Sc., Assoc. Prof. (Voronezh)

T.A. Kravchenko, Dr. Sc., Prof. (Voronezh)

S.N. Lanin, Dr.Sc., Prof. (MSU, Moscow)

V.M. Mukhin, Dr.Sc., Prof. (SPA «Neorganika», Electrosil')

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Responsible secretaries:

I.V. Voronyuk, Ph.D. (Voronezh)

L.N. Kolomietz, Ph.D. (IPCE RAS, Moscow)

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

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



© Voronezh State University, 2024

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

2024, Том 24, №3



Выходит 6 раз в год

CONTENTS

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- | | | |
|---|---------|--|
| <p>Максимов Г.С., Шемякина А.О., Ужель А.С., Чернобровкина А.В.
Изучение хроматографических свойств гиперразветвленного зwitterионного сорбента на основе силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии</p> | 304-320 | <p>Maksimov G.S., Shemiakina A. O., Uzhel A.S., Chernobrovkina A.V.
Study of chromatographic properties of the developed hyperbranched zwitterionic silica-based stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography</p> |
| <p>Шапошник А.В., Звягин А.А., Арефьева О.А., Рябцев С.В., Дьяконова О.В., Васильев А.А.
Хемосорбция водорода на оксидах металлов с добавками оксида палладия (II)</p> | 321-334 | <p>Shaposhnik A.V., Zvyagin A.A., Arefieva O.A., Ryabtsev S.V., Dyakonova O.V., Vasilyev A.A.
Chemisorption of hydrogen on metal oxides with palladium (II) oxide additives</p> |
| <p>Саранов И.А., Рудаков Я.О., Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Полянский К.К., Лукин А.Н.
Методы ГЖХ, ДСК и ИК-спектроскопии в изучении коровьего молочного жира</p> | 335-352 | <p>Saranov I.A., Rudakov Ya.O., Rudakov O.B., Selemenev V.F., Polyansky K.K., Lukin A.N.
GLC, DSC, and IR spectroscopy methods in the study of bovine milk fat</p> |
| <p>Шаяхметова Р.Х., Гуськов В.Ю.
Молекулярно-динамическое моделирование адсорбции оптических изомеров лейцина на хиральной супрамолекулярной поверхности γ-глицина</p> | 353-363 | <p>Shayakhmetova R. h., Guskov V.Yu.
Molecular-dynamic modelling of the adsorption of optical isomers of leucine on the chiral supramolecular surface of γ-glycine</p> |
| <p>Коневник Ю.В., Мартынов К.В., Кулюхин С.А., Захарова Е.В.
Влияние продуктов выщелачивания натрий-алюмофосфатного стекла на сорбционное поведение глин по отношению к радионуклидам</p> | 364-372 | <p>Konevnik Yu.V., Martynov K.V., Kulyukhin S.A., Zakharova E.V.
Influence of Na-Al phosphate glass leachates in clays sorption behavior toward radionuclides</p> |
| <p>Гриневич О.И., Шолохова А.Ю., Матюшин Д.Д.
Особенности удерживания азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ-МС</p> | 373-385 | <p>Grinevich O.I., Sholokhova A.Yu., Matyushin D.D.
The retention features of nitrogen-containing heterocyclic compounds in reversed-phase and hydrophilic HPLC-MS modes</p> |

- Агарков А.А., Попов С.С., Попова Т.Н.**
Активность глутатионредуктазы при нарушении функции печени и регуляция интермедиатами цикла Кребса каталитического действия фермента, выделенного с помощью хроматографических методов
- Анохина Г.Б., Плотникова Е.В., Епринцев А.Т.**
Определение молекулярной массы нативных молекул изоформ γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы, полученных из проростков кукурузы (*Zea mays* L.), методом гель-хроматографии
- Лавлинская М.С., Сорокин А.В., Гончарова С.С., Кондратьев М.С., Михайлова А.А., Кузнецов Е.И., Балбеков Н.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.**
Исследование особенностей взаимодействия поверхности бромелина и карбоксиметилцеллюлозы в процессе их адсорбционной иммобилизации
- Чернышова Е.В., Крутских Е.П., Бабенкова П.И., Нестерова В.В., Певзнер И.Б., Плотников Е.Ю., Гуреев А.П.**
Влияние ресвератрола на сорбцию фосфорилированного ТАУ-белка и MAPT на PVDF-мембрану в мышинной модели болезни Альцгеймера
- Гатаулина М.О., Епринцев А.Т.**
Применение ионообменной хроматографии для очистки глиоксилатредуктазы из листьев кукурузы и исследование ее характеристик
- 386-394 **Agarkov A.A., Popov S.S., Popova T.N.**
The activity of glutathione reductase under impaired liver function and regulation by the Krebs cycle intermediates of the catalytic action of the enzyme isolated by chromatographic methods
- 395-402 **Anokhina G.B., Plotnikova E.V., Eprintsev A.T.**
Determination of the molecular weight of native molecules of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase isoforms obtained from maize (*Zea mays* L.) seedlings by gel chromatography
- 403-414 **Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Goncharova S.S., Kondratiev M.S., Mikhaylova A.A., Kuznetsov E.I., Balbekov N.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G.**
Study of bromelain and carboxymethyl cellulose surface in-teraction features in the process of their adsorption immobilisation
- 415-425 **Chernyshova E.V., Krutskikh E.P., Babenkova P.I., Nesterova V.V., Pevzner I.B., Plotnikov E.Yu., Gureev A.P.**
Influence of resveratrol on the sorption of phosphorylated tau protein and MAPT on the PVDF membrane in a mouse model of Alzheimer's disease
- 426-431 **Gataullina M.O., Eprintsev A.T.**
Using ion exchange chromatogphy for the purification of glyoxylate reductase from corn leaves and studying its characteristics



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12234

Изучение хроматографических свойств разработанного гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента на основе силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии

**Григорий Сергеевич Максимов, Анна Олеговна Шемякина,
Анна Станиславовна Ужель, Алла Валерьевна Чернобровкина**

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru

Аннотация. Целью данной работы являлось получение неподвижной фазы для гидрофильной хроматографии с гиперразветвленным функциональным слоем, содержащей цвиттер-ионные группы, и изучение её хроматографических свойств с использованием модельных веществ разнообразных кислотно-основных характеристик. В качестве системы для тестирования взаимодействий аналитов с неподвижной фазой применяли набор подвижных фаз различной кислотности, содержащих 90 об.% ацетонитрила. Для оценки вклада ионного обмена в удерживание заряженных соединений при крайних рассматриваемых значениях pH проводили варьирование концентрации элюирующего иона.

Было установлено, что во всём диапазоне w_pH подвижной фазы от 2.85 до 5.76 (s_pH 5.5-9.2) у сорбента преобладали анионообменные свойства, которые были обеспечены влиянием четвертичных аминогрупп, сформированных в первом и втором функциональных слоях на поверхности матрицы. Это привело к низким факторам удерживания катиона тиамина, характеризующегося высокой гидрофильностью ($\log D = -4.20$), во всех рассматриваемых условиях. Однако факторы удерживания и вклад ионного обмена для органических анионов значительно снижались с ростом pH, что, по-видимому, было вызвано увеличением степени диссоциации карбоксильных, остаточных силанольных и протонированных аминогрупп сорбента. При этом было отмечено уменьшение удерживания нейтральных аналитов, что, вероятно, было вызвано снижением толщины приповерхностного водного слоя неподвижной фазы, принимающего непосредственное участие в механизме распределения, и возможным изменением силы адсорбционных взаимодействий.

Для слабых кислот были получены неожиданные зависимости удерживания при варьировании состава подвижной фазы. Для бензойной кислоты, практически недиссоциированной при w_pH элюента, равном 2.85, установлен высокий вклад ионного обмена – вплоть до 80% при 1.25 мМ концентрации элюирующего иона в подвижной фазе. В случае ксантина показан существенный рост факторов удерживания и вклада электростатических взаимодействий с увеличением pH элюента, что не согласовалось с величиной его w_pK_a , равной 7.60. Отмеченные наблюдения свидетельствовали в пользу применения водно-органической шкалы pH при работе в гидрофильном режиме хроматографии и учёта влияния ионного обмена на удерживание аналитов даже при низкой степени их диссоциации.

Таким образом, разработанный способ создания гиперразветвленного цвиттер-ионного функционального слоя на поверхности 3-аминопропилсиликагеля обеспечил получение неподвижной фазы с преобладающими анионообменными свойствами в рабочем диапазоне pH. Варьирование кислотности и концентрации буферного раствора подвижной фазы позволило подбирать условия эффективного и селективного разделения многокомпонентной смеси, содержащей вещества различной гидрофильности и заряда.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, цвиттер-ионный сорбент, подвижная фаза, механизм удерживания.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-73-01145, с использованием оборудования ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», приобретенного МГУ по программе обновления приборной базы в рамках национального проекта «Наука» и в рамках Программы развития МГУ. Авторы выражают благодарность Соболеву Н.А. за данные элементного анализа.



Для цитирования: Максимов Г.С., Шемякина А.О., Ужель А.С., Чернобровкина А.В. Изучение хроматографических свойств разработанного гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента на основе силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 304-320. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12234>

Original article

Study of chromatographic properties of the developed hyperbranched zwitterionic silica-based stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography

Grigori S. Maksimov, Anna O. Shemiakina,
Anna S. Uzhel, Alla V. Chernobrovkina 

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru 

Abstract. The aim of this work was to obtain a separation material with hyperbranched functional layer containing zwitterionic groups for hydrophilic interaction liquid chromatography and to characterize solute-adsorbent interactions using test compounds of various acid-base properties. A set of mobile phases with varying acidity containing 90 vol.% of acetonitrile were used for testing the interactions of analytes with the stationary phase. The concentration of the eluting ion was varied in order to evaluate the contribution of ion exchange to the retention of charged compounds at the extremes of considered pH values.

It was found that throughout the entire w pH range of mobile phase from 2.85 to 5.76 (s pH 5.5-9.2), the adsorbent provided predominantly anion-exchange properties. It was caused by the quaternary amino groups formed in the first and second functional layers on the surface of the substrate. As a result, low retention factors under all the conditions for highly hydrophilic cation thiamine ($\log D = -4.20$) were obtained. However, the retention factors and ion exchange contribution for organic anions decreased significantly with increasing pH. It was likely caused by an increase in dissociation of carboxyl, residual silanol and protonated amino groups of the stationary phase. At the same time, a decrease of the neutral analytes' retention was noted. This was probably caused by a decrease of the adsorbed aqueous layer thickness of the stationary phase, which was directly involved in partitioning mechanism. Moreover, a possible change in the strength of adsorption solute-adsorbent interactions was involved.

Unexpected retention dependences were obtained for weak acids, when the composition of the mobile phase was varied. For benzoic acid, practically undissociated at w pH 2.85 of the eluent, a high contribution of ion exchange to its retention was established up to 80% at 1.25 mM concentration of the eluting ion in the mobile phase. A significant increase in retention factors and the contribution of electrostatic interactions was shown for xanthine with increasing eluent pH, which was not consistent with its w pK_a value of 7.60. The observations indicated in favor of using aqueous-organic pH scale when working in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode and taking into account the influence of ion exchange on the retention of analytes even at a low degree of their dissociation.

Thus, the developed method for creating a hyperbranched zwitterionic functional layer on the surface of 3-aminopropylsilica lead to the production of a stationary phase with predominant anion-exchange properties in the working pH range. Varying the acidity and concentration of the buffer solution of the mobile phase allowed to select the conditions suitable for the separation of a multicomponent mixture containing substances of different hydrophilicity and charge.

Keywords: hydrophilic interaction liquid chromatography, zwitterionic stationary phase, mobile phase, retention mechanism.

Acknowledgments: this study was supported by Russian Science Foundation, grant No. 23-73-01145 using the equipment provided by the Centre for Collective Use of Moscow State University "Technologies for obtaining new nanostructured materials and their comprehensive study" purchased by Moscow State University as part of the equipment update in the framework of the national project "Science" and the Development Program for the Lomonosov Moscow State University.

For citation: Maksimov G.S., Shemiakina A. O., Uzhel A.S., Chernobrovkina A.V. Study of chromatographic properties of the developed hyperbranched zwitterionic silica-based stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 304-320. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12234>

Введение

Гидрофильная хроматография (ГИХ) представляет собой перспективный метод определения полярных органических соединений и находит широкое применение в таких областях как фармакология, протеомика, метаболомика [1,2]. В данном варианте хроматографии используют полярные неподвижные фазы – в основном силикагель, модифицированный разнообразными функциональными группами [3], и полярные элюенты, содержащие менее 40 об.% водной компоненты [2]. В режиме ГИХ за счет взаимодействий различной природы реализуется сложный механизм удерживания, который в основном представлен процессами распределения, адсорбции и ионного обмена [2]. Это позволяет обеспечивать уникальную селективность разделения не только веществ, отличающихся по гидрофильности, но и обладающих заряженными фрагментами в своей структуре [4]. Характеристики разделения в первую очередь определяются свойствами неподвижной фазы.

Одними из наиболее востребованных неподвижных фаз для ГИХ, характеризующихся повышенной гидрофильностью [5], являются цвиттер-ионные сорбенты. Благодаря наличию в их функциональном слое групп разных зарядов электростатические взаимодействия противоположного действия (притяжение и отталкивание) с ионизированными аналитами скомпенсированы, а распределение и адсорбция вносят существенный вклад в удерживание [6]. При этом пространственное разделение заряда на поверхности сорбента приводит к уникальной возможности одновременного определения противоположно заряженных соединений [7]. Однако число подобных коммерчески доступных сорбентов невелико, к ним относятся колонки SeQuant ZIC-HILIC, ZIC-pHILIC, ZIC-cHILIC, а также Synchronis HILIC и несколько аналогов. Разработка новых неподвижных фаз с

различной структурой цвиттер-ионного функционального слоя позволит установить способы управления их селективностью и создать сорбент с повышенной разделяющей способностью. Перспективным подходом может служить формирование гиперразветвленного функционального слоя на поверхности силикагеля с возможностью введения цвиттер-ионов как во внутреннюю, так и во внешнюю его часть [8]. К числу преимуществ гиперразветвленных сорбентов относится возможность экранирования матрицы, что позволяет надежнее контролировать ионообменные свойства, а также улучшения селективности разделения соединений разной природы при варьировании количества привитых функциональных слоев.

В практике ГИХ существует необходимость описания свойств неподвижных фаз с целью их дальнейшего подбора для решения определенных аналитических задач. Наиболее распространенным средством характеристики гидрофильных неподвижных фаз является тест Танака [9]. Однако его результаты не могут полностью предсказать хроматографические возможности сорбентов, так как описывают их свойства при фиксированном составе подвижной фазы. Для более подробной характеристики взаимодействий сорбат-сорбент в гидрофильном режиме следует рассматривать влияние состава элюента на свойства неподвижной фазы. От условий эксперимента существенно зависит реализация ионного обмена.

Кислотность подвижной фазы, которая определяет степень диссоциации как групп на поверхности сорбента, так и аналита, является ключевым параметром, регулирующим электростатические взаимодействия в системе и, как следствие, существенно влияющим на селективность разделения смесей [10]. По удерживанию соединений, имеющих постоянный заряд, было показано уменьшение числа протонированных аминогрупп у аминофазы [11] и увеличение степени

диссоциации силанольных групп у силикагеля [12] при возрастании рН элюента. Для нейтральных и цвиттер-ионных фаз на основе силикагеля также было отмечено увеличение их катионообменных свойств за счёт диссоциации немодифицированных силанольных групп [13,14]. Кроме того необходимо учитывать степень диссоциации самого определяемого вещества, влияющую на его гидрофильность и возможность реализации электростатических взаимодействий с неподвижной фазой [15].

Для понимания характера взаимодействий у поверхности неподвижной фазы важным является изучение влияния концентрации буферного раствора подвижной фазы на удерживание определяемых соединений [16]. Увеличение концентрации уменьшает силу электростатических взаимодействий в системе вследствие экранирования заряда групп сорбента, а также приводит к росту толщины приповерхностного водного слоя, определяющего механизм распределения [13,14,17].

Таким образом, чтобы подбирать неподвижную фазу и условия разделения, подходящие для конкретной задачи, необходимо детально рассматривать взаимодействия сорбат-сорбент в широком диапазоне условий. Целью данной работы было изучение свойств полученного синтетическим путем гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента на основе 3-аминопропилсиликагеля посредством установления зависимости удерживания

соединений разных классов в режиме гидрофильной хроматографии от рН и концентрации элюирующего иона в подвижной фазе.

Экспериментальная часть

Получение сорбента. В качестве матрицы использовали силикагель с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин, диаметр частиц 5 мкм («БиоХиммак СТ», Россия).

На первой стадии синтеза сорбента для закрепления и пространственного удаления функциональных групп от поверхности матрицы модифицировали 3-аминопропилсиликагель, в качестве алкилирующего агента использовали 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир (1,4-БДДГЭ). 12 г 3-аминопропилсиликагеля помещали в реактор объемом 150 см³, добавляли 80 см³ дистиллированной воды и 12 см³ 1,4-БДДГЭ. Реакционную смесь перемешивали с помощью мешалки при температуре 60°C в течение 30 минут со скоростью 700 об/мин. Далее сорбент отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре, промывали 300 см³ деионизованной воды, 100 см³ ацетонитрила и высушивали на воздухе. На второй стадии проводили аминирование полученного сорбента таурином: в реактор помещали 4.5 г сорбента, 90 см³ воды и 2.53 г таурина. Реакцию проводили при 60°C и перемешивании со скоростью 700 об/мин в течение 60 минут. Далее проводили формирование второго слоя спейсера

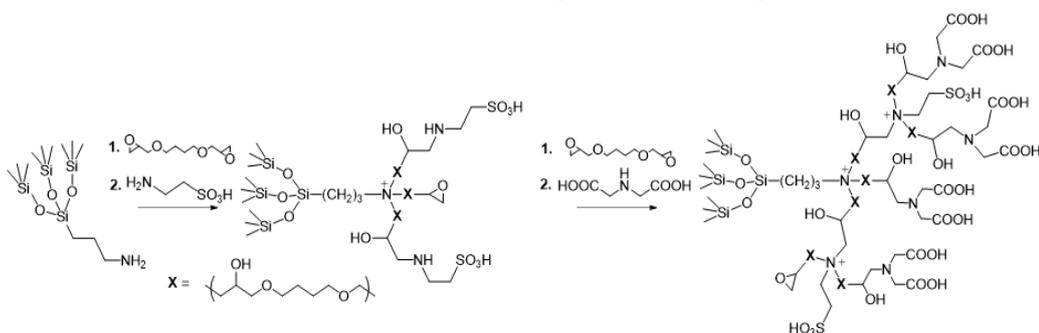


Рис. 1. Схема синтеза и предполагаемая структура гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента, модифицированного таурином и иминодиуксусной кислотой

Fig. 1. Synthesis scheme and the proposed structure of a hyperbranched zwitterionic adsorbent modified with taurine and iminodiacetic acid

с 1,4-БДДГЭ. В качестве второго цвиттер-ионного слоя вводили иминодиуксусную кислоту (рис.1). Количество добавляемых реагентов при закреплении второго слоя увеличивали в два раза.

Результаты элементного анализа для промежуточных этапов синтеза гиперразветвленного сорбента свидетельствовали о приросте функционального слоя в соответствии с увеличением доли углерода (от 5.84% С для матрицы до 12.65% С и 0.03% S после введения первого слоя спейсера и таурина, 13.77% С после 2 цикла модифицирования 1,4-БДДГЭ и 14.28% после закреплении иминодиуксусной кислоты), а содержание серы являлось показателем успешного введения таурина в структуру сорбента.

Заполнение хроматографической колонки проводили под давлением 250 бар, используя суспензию сорбента в растворе состава 0.1М КСl : этанол : 1,4-диоксан в соотношении 5:4:1. В качестве подвижной фазы использовали предварительно дегазированный ацетонитрил. Для набивки колонки использовали хлорид калия ч. д. а. (Panreac, Испания); этанол ч.д.а. (Лабтех, Россия); 1,4-диоксан ч.д.а. (Компонент-Реактив, Россия).

Подвижная фаза. В качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил для ВЭЖХ «Компонент-реактив», деионизованную воду (Merck Millipore). Для создания буферных систем с требуемым значением рН использовали ледяную уксусную кислоту (99.5%) Panreac, Испания; муравьиную кислоту (99.7%, Россия), гидроксид натрия ч.д.а. (Россия). Значения рН измеряли как в водном растворе (^wpH), так и в подвижной фазе, содержащей 90 об.% ацетонитрила (^spH) [18], с использованием рН-метра, калиброванного по водным стандартным растворам. Доверительный интервал для ^spH составил ± 0.1 . Для создания ^wpH 2.85 (^spH 5.5) использовали муравьиную кислоту ($^w\text{pK}_a$ 3.75) с общей концентрацией в водной части

элюента 112, 224, 447 мМ, соответствующей концентрации элюирующего аниона в подвижной фазе [ЭИ] – 5, 2.5, 1.25 мМ соответственно. Уксусную кислоту ($^w\text{pK}_a$ 4.76) использовали для создания 104 мМ буферного раствора с ^wpH 4.26 (^spH 7.6) ([ЭИ] = 2.5 мМ), а также для буферных систем с ^wpH 5.76 (^spH 9.2) и общей концентрации до добавления ацетонитрила, равной 27.5, 55, 82.5 мМ и соответствующей концентрации элюирующего иона в подвижной фазе 2.5, 5, 7.5 мМ. Буферные растворы готовили *in situ* путем титрования раствора кислоты 0.5 М раствором гидроксида натрия, используя рН-метр «рН-420» («Аквилон», Россия), калиброванный по трем стандартным водным растворам со значениями ^wpH 4.01, 6.86 и 9.18.

Тестовые соединения. Изучение взаимодействий сорбат-сорбент при изменении состава подвижной фазы проводили на основании измерения факторов удерживания 11 тестовых соединений различных классов (табл. 1), включающих катионы (TMPAC, VBTMAC, B1), анионы (SPTS, SPSS), слабые кислоты (ксантин, бензойная кислота), слабые основания (бензиламин), а также нейтральные вещества (урацил, уридин, цитозин). При этом в каждой группе аналиты различались по своей гидрофильности в соответствии с параметром Ханша ($\log P$, $\log D$) следующим образом: VBTMAC < TMPAC < B1; SPSS < SPTS; урацил < уридин < цитозин. Для веществ, способных изменять заряд в зависимости от кислотности среды, были рассчитаны коэффициенты распределения в системе н-октанол/вода для двух форм их существования в растворе. Факторы удерживания всех соединений рассчитывали относительно времени удерживания толуола х. ч. (Компонент-Реактив, Россия), соответствующего маркеру мертвого времени в режиме гидрофильной хроматографии. Пробы готовили в смеси вода/ацетонитрил 10/90 об.%, соответствующей составу подвижной фазы. Времена удерживания тестовых аналитов

Таблица 1. Структурные формулы исследуемых соединений, физико-химические свойства, концентрации в индивидуальных растворах и в модельной смеси
 Table 1. Structures of the test compounds, their physicochemical properties, and the concentrations in single runs and in the mixture

Соединение	Структурная формула	logP*	$w_p K_a^*$	logD*	Концентрация в индивидуальном растворе, мг/дм ³	Концентрация в смеси, мг/дм ³
ТМРАС, хлорид триметилфениламмония		-	-	-1.45	100	130
ВТМАС, хлорид (α-винилбензил)-триметиламмония		-	-	-1.22	100	-
В1, тиамин		-	-	-4.20	100	2
SPTS, п-толуолсульфонат натрия		-	-	-2.57	100	235
SPSS, п-стиролсульфонат натрия		-	-	-3.39	100	-
бензойная кислота		1.56	4.20	-1.59	100	120
ксантин		-0.73	7.60	-1.13	10	10
бензиламин		1.36	9.33	-1.74	500	100
урацил		-1.04	-	-	100	-
уридин		-1.58	-	-	100	5
цитозин		-1.73	-	-	10	10

*параметры рассчитаны при помощи функционала программы ACD/Labs 12.01 (Канада). Величины logD относятся к заряженным формам соединений.

устанавливали по хроматограммам для индивидуальных растворов.

Оценка вклада ионного обмена. Для заряженных соединений получали зависимости факторов удерживания от концентрации элюирующего иона [ЭИ] в

форме уравнения ионного обмена: $k' = f(1/[ЭИ])$. При экстраполяции на бесконечно большую концентрацию ЭИ, когда ионный обмен полностью подавлен, $k'_{IEX} = 0$, были получены факторы удержи-

вания, вызванные неэлектростатическими взаимодействиями $k'_{ГИХ}$ [19,20]. Принимая постоянными величины $k'_{ГИХ}$, определяли вклады ионного обмена в удерживание соединений для всех значений концентрации элюирующего иона. При этом общее удерживание рассматривали как сумму $k'_{ГИХ}$ и $k'_{ИЕХ}$.

Для ионизируемых в исследуемом диапазоне кислотности соединений также рассчитывали влияние электростатических взаимодействий на общее изменение удерживания $\Delta k'_{ИЕХ}/\Delta k'$ при варьировании pH:

$$\frac{\Delta k'_{ИЕХ}}{\Delta k'}(pH_1 \rightarrow pH_2) = \frac{k'_{ИЕХ}(pH_2) - k'_{ИЕХ}(pH_1)}{k'_{2'}(pH_2) - k'_{1'}(pH_1)} \\ = \frac{(k'_{2'}(pH_2) - k'_{ГИХ}(pH_2)) - (k'_{1'}(pH_1) - k'_{ГИХ}(pH_1))}{k'_{2'}(pH_2) - k'_{1'}(pH_1)}$$

где $k'_{ГИХ}$ – соответствует свободному члену зависимости в форме уравнения ионного обмена.

Оборудование. Для проведения синтеза сорбента использовали следующее оборудование: термостат («Mettmert», Германия), водоструйный насос, мешалка Metrohm 802, термостатируемый сосуд для титрования Metrohm на 150 см³. В работе использовали стальную колонку размером 100 × 3 мм, которую заполняли при помощи пневмонасоса Knauer K-1900 (Knauer, Германия) с воздушным компрессором Fini (Италия).

Для отбора точной аликвоты использовали автоматические дозаторы LAVMATE объемом 10-100, 20-200, 100-1000 и 1000-5000 мкл с пределом допустимой погрешности измерения не более ±5% («HTL», Польша). Взятие навесок проводили на весах Explorer Pro («Ohaus Corporation», США), точность которых составляла 0.0001 г.

Для проведения хроматографического эксперимента использовали: жидкостной хроматограф Vanquish Flex с флуоресцентным детектором FLD и диодно-матричным детектором DAD (Thermo Scientific, США); жидкостной хроматограф Dionex UltiMate 3000, оснащенный четырехканальным градиентным насосом, ав-

томатической системой ввода пробы, термостатом колонки, диодным спектрофотометрическим детектором. Хроматограммы регистрировали с помощью персонального компьютера и программного пакета Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, США). Также применяли элементный анализатор PerkinElmer 2400 Series II CHNS Elemental Analyzer (PerkinElmer, Boston, США).

Обсуждение результатов

В результате проведения модифицирования 3-аминопропилсиликагеля в соответствии со схемой на рис. 1 был получен новый цвиттер-ионный сорбент с гиперразветвленным функциональным слоем, во внутреннем слое которого содержались сильнокислотные сульфогруппы, во внешнем – карбоксильные, сформированные с использованием иминодиуксусной кислоты. Исходя из предполагаемой структуры продукта синтеза, можно ожидать наличие постоянного положительного заряда за счет кватернизованного азота и отрицательного заряда за счет депротонированных сульфогрупп. Может возникнуть дополнительный отрицательный заряд при увеличении pH из-за диссоциации карбоксильных групп в структуре слоя, а также остаточных силанольных групп матрицы. Кроме того, в функциональном слое возможно присутствие аминокрупп разной степени замещенности, величины $w_p K_a(BH^+)$ которых лежат в диапазоне 9-10. Однако, в подвижной фазе, насыщенной ацетонитрилом, эти величины снижены [21], поэтому ожидаемо уменьшение эффективного положительного заряда за счет депротонирования аминокрупп при увеличении $w_p pH$ уже в выбранном рабочем диапазоне.

Для демонстрации свойств новой неподвижной фазы и изучения характера взаимодействий сорбат-сорбент варьировали два параметра подвижной фазы:

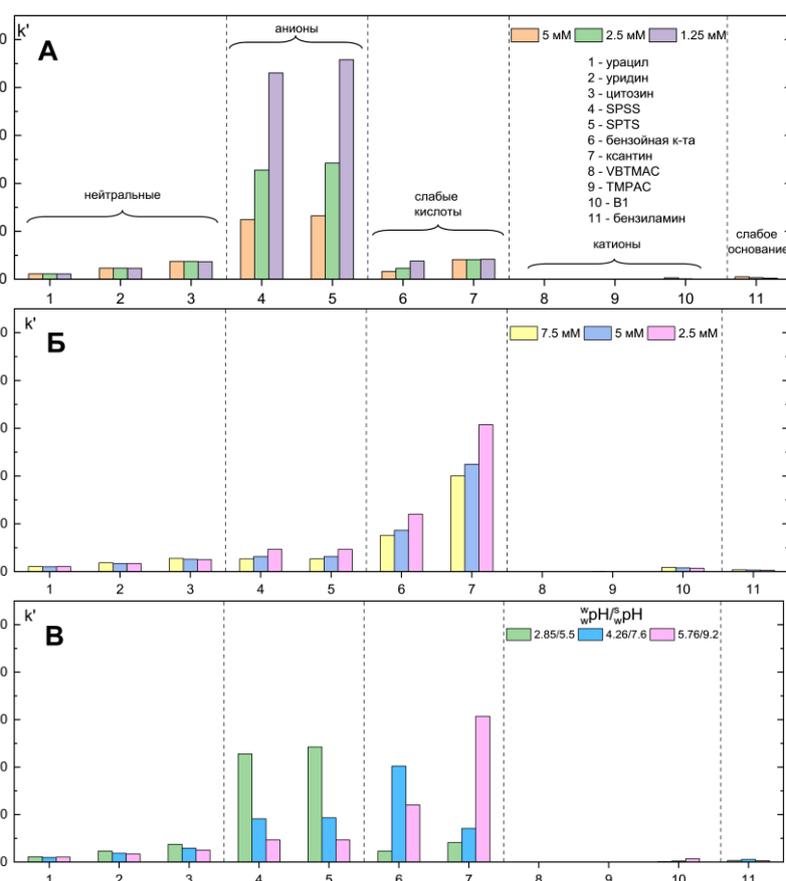


Рис. 2. Величины факторов удерживания тестовых соединений: А) при w_{pH} 2.85 в диапазоне концентраций элюирующего иона 1.25-5 мМ; Б) при w_{pH} 5.76 в диапазоне концентраций элюирующего иона 2.5-7.5 мМ; В) в диапазоне значений w_{pH} 2.85-5.76 (s_{pH} 5.5-9.2) при концентрации элюирующего иона 2.5 мМ. Все концентрации относятся к подвижной фазе. Условия: неподвижная фаза – Т-Б-ИД (размер колонки 3×100 мм); подвижная фаза - формиатный w_{pH} 2.85 или ацетатный w_{pH} 4.26 или 5.76 буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%; скорость потока 1 см³/мин; УФ-детектирование при 254 нм.

Fig. 2. Retention factors of the test compounds: А) at w_{pH} 2.85 in the range of eluting ion concentrations 1.25-5 mM; Б) at w_{pH} 5.76 in the range of eluting ion concentrations 2.5-7.5 mM; С) in the range of w_{pH} 2.85-5.76 (s_{pH} 5.5-9.2) at eluting ion concentration 2.5 mM. All concentrations belong to the mobile phase. Conditions: stationary phase – T-B-ID (column size 3×100 mm); mobile phase – formate w_{pH} 2.85 or acetate w_{pH} 4.26 or 5.76 buffer solution / acetonitrile 10/90 vol.%; flow rate 1 cm³/min; UV detection at 254 nm

кислотность и концентрацию элюирующего иона. Для установления изолированного влияния каждого из факторов остальные условия фиксировали. В результате получили зависимости факторов удерживания тестовых анализов (табл. 1) от кислотности подвижной фазы. При w_{pH} 2.85 и 5.76 оценили влияние концентрации элюирующего иона на удерживание выбранных модельных веществ разных классов.

Варьирование концентрации при w_{pH} 2.85. При низком w_{pH} подвижной фазы, равном 2.85 (s_{pH} 5.5), своё влияние на удерживание ионизированных соединений могут проявлять разделенные в пространстве положительно заряженные аммониевые- и аминогруппы, полученные при формировании первого и второго слоя спейсера в гиперразветвленной структуре (рис. 1), и отрицательно заряженные сульфогруппы во внутреннем

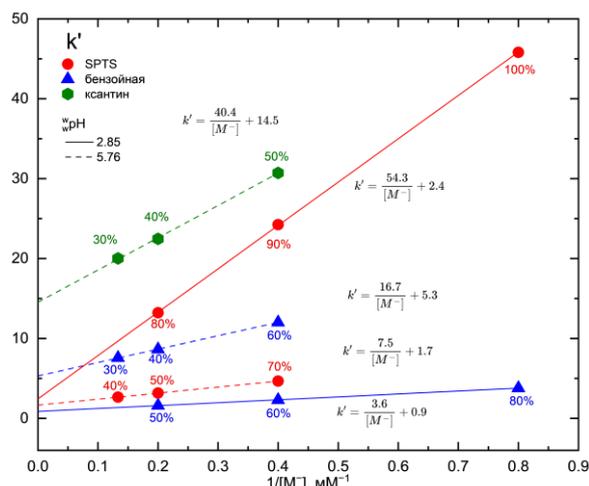


Рис. 3. Зависимости $k' = f(1/[M^-])$, полученные при w_pH 2.85 и 5.76 для диапазона концентраций элюирующего иона 1.25-5 и 2.5-7.5 мМ соответственно. Проценты относятся к величине вклада ионного обмена в удерживание соединения. Коэффициенты корреляции r для всех зависимостей равны 1.000. Остальные условия приведены в подписи к рис. 2.

Fig. 3. Dependencies $k' = f(1/[M^-])$ obtained at w_pH 2.85 and 5.76 for the range of eluting ion concentrations 1.25-5 and 2.5-7.5 mM, respectively. The percentages refer to impact of ion exchange mechanism to the compound retention. Correlation coefficients r for all dependencies are 1.000. Other conditions are presented in the Fig. 2 caption.

слое, что может приводить к преобладанию тех или иных ионообменных свойств. В данных условиях анионы сульфокислот имели высокие факторы удерживания (k' до 45), а катионы ТМРАС и ВВТМАС не удерживались (рис. 2А), что свидетельствовало о преобладании анионообменных свойств сорбента.

Для анионов и слабых кислот получили зависимости факторов удерживания от концентрации элюирующего иона в форме уравнения ионного обмена (рис. 3). Используя процедуру, описанную в Экспериментальной части (Оценка вклада ионного обмена), оценили их удерживание за счёт неэлектростатических взаимодействий $k'_{ГИХ}$ (табл. 2), а также вклады ионного обмена (рис. 3). Было показано, что электростатические взаимодействия объясняют до 100% удерживания SPTS и SPSS при 1.25 мМ концентрации формиат-аниона в подвижной фазе. Полученные данные подтвердили предположение о характере свойств сорбента.

Для бензойной кислоты наблюдали аналогичное сульфатам увеличение

удерживания с уменьшением концентрации, при этом вклад ионного обмена в тех же условиях составил 80%. Однако, при w_pH 2.85, если рассматривать степень диссоциации кислоты, опираясь на водную шкалу, в диссоциированной форме находилось около 4% молекул. Это справедливо и при рассмотрении степени диссоциации в растворе с содержанием ацетонитрила 90%, в котором w_pK_a кислоты равна примерно 6.8 [21]. При этом для ксантина с более высоким значением константы кислотности (табл. 1) вклад ионного обмена отсутствовал. Его фактор удерживания, как в случае нейтральных соединений, практически не зависел от концентрации элюирующего иона, что согласовалось с его нахождением в недиссоциированной форме при рассматриваемом w_pH . Слабое влияние концентрации на удерживание нейтральных соединений (рис. 2А) было вызвано незначительным увеличением толщины приповерхностного водного слоя [17], определяющей реализацию распределительного механизма удерживания.

Таблица 2. Факторы удерживания k' анионов и слабых кислот при 2.5 мМ концентрации элюирующего иона и $w\text{pH}$ 2.85, 5.76, факторы удерживания $k'_{\text{ГИХ}}$ за счёт неэлектростатических взаимодействий, соответствующие свободным членам в уравнениях на рис. 3, относительное изменение факторов удерживания $\Delta k'_{\text{IEХ}}/\Delta k'$, вызванное электростатическими взаимодействиями. Остальные условия приведены в подписи к рис. 2

Table 2. Retention factors k' of the anions and weak acids at 2.5 mM concentration of the eluting ion and $w\text{pH}$ 2.85, 5.76, retention factors $k'_{\text{НЛС}}$ due to non-electrostatic interactions corresponding to the free terms in the equations in Fig. 3, relative change in retention factors $\Delta k'_{\text{IEХ}}/\Delta k'$ caused by electrostatic interactions. Other conditions are presented in the Fig. 2 caption

$w\text{pH}/s\text{pH}$	2.85/5.5		5.76/9.2		$\Delta k'_{\text{IEХ}}/\Delta k'$, %	
	соединения	k'	$k'_{\text{ГИХ}}$	k'		$k'_{\text{ГИХ}}$
SPSS		22.8	2.3	4.7	1.6	-100
SPTS		24.3	2.4	4.7	1.7	-100
бензойная кислота		2.3	0.9	12.0	5.3	50
ксантин		4.1	4.1	30.7	14.5	60

Возможное объяснение высокого вклада ионного обмена в удерживание практически недиссоциированной бензойной кислоты может быть связано со смещением положения кислотно-основного равновесия за счёт процесса обмена противоионов подвижной фазы на бензоат-анионы у заряженных центров неподвижной фазы. Результирующее время удерживания вещества при этом представляет взвешенное среднее от времен удерживания каждой из его форм [15, 21]. Для подтверждения данного предположения будут проведены дополнительные эксперименты по оценке величины константы ионного обмена.

Среди группы катионов незначительно удерживался тиамин, обладающий высокой гидрофильностью ($\log D -4.2$), а также протонированный при данном $w\text{pH}$ бензиламин (рис. 2А). При этом было отмечено снижение факторов удерживания витамина В1 и бензиламина вплоть до элюирования с мертвым объемом при уменьшении концентрации буферного раствора, что связано с ослаблением экранирования положительного заряда на поверхности сорбента и, как следствие, увеличением электростатического отталкивания одноименных зарядов. Ионного обмена для катионов за счёт вза-

имодействия с отрицательно заряженными сульфогруппами не наблюдали, что свидетельствовало об однозначном преобладании анионообменных свойств неподвижной фазы.

Эффективность для анионов и бензойной кислоты увеличивалась на 20% с уменьшением концентрации буферного раствора в 4 раза (табл. 3). Для нейтральных соединений из класса азотистых оснований и нуклеозидов (урацил, уридин, цитозин, ксантин) рассчитанная эффективность имела близкие значения, которые были в 1.5-2 раза ниже таковых для анионов. Для тиамина и бензиламина, на удерживание которых влияло отталкивание от заряженных групп сорбента, наблюдали низкую эффективность. Наилучшая симметрия пиков всех веществ была получена при наибольшей концентрации формиата в подвижной фазе.

При $w\text{pH}$ 2.85 ($s\text{pH}$ 5.5) для трех концентраций элюирующего иона в подвижной фазе получили хроматограммы модельной смеси (табл. 1), содержащей 8 соединений разных классов и заряда (рис. 4А). Стоит отметить, что порядок элюирования веществ из одной группы (нейтральных и отрицательно заряженных соединений) согласовался с их гидрофильностью, что свидетельствовало о

Таблица 3. Эффективность колонки (тп/м) при w_pH 2.85; 4.26; 5.76 в соответствующих диапазонах концентрации элюирующего иона в подвижной фазе. Остальные условия приведены в подписи к рис. 2

Table 3. Efficiency (tp/m) at w_pH 2.85; 4.26; 5.76 in the corresponding concentration ranges of the eluting ion in the mobile phase. Other conditions are presented in the Fig. 2 caption.

w_pH / s_pH	2.85/5.5			4.26/7.6	5.76/9.2		
Концентрация ЭИ, мМ	5	2.5	1.25	2.5	7.5	5	2.5
SPSS	31000	36000	37000	23000	14000	10000	3000
SPTS	29000	35000	36000	18000	12000	9000	4000
бензойная к-та	10000	10000	15000	34000	25000	27000	30000
ксантин	19000	22000	19000	12000	21000	22000	24000
урацил	15000	17000	14000	14000	17000	16000	15000
уридин	16000	19000	16000	15000	17000	16000	15000
цитозин	20000	23000	19000	19000	21000	20000	18000
B1	7000	7000	5000	6000	8000	7000	6000
бензиламин	6000	5000	3000	6000	8000	8000	7000

влиянии распределения на их удерживание.

Полного разделения смеси при данной кислотности подвижной фазы добиться не удалось. Во всём рассматриваемом диапазоне концентраций формиат-аниона пара веществ тиамин-бензиламин не разделялась, что было вызвано их слабым удерживанием при рассматриваемом pH вследствие отталкивания. Также не удалось добиться разрешения до базовой линии цитозина и ксантина, что связано с малой эффективностью воздействия концентрации буферного раствора на селективность их разделения. Разрешение максимально возможного при данном pH числа компонентов за меньшее время (8 мин) было получено при наибольшей из рассматриваемых концентраций (рис. 4А), при которой отмечена лучшая симметрия пиков.

Таким образом, высокая анионообменная способность сорбента при w_pH 2.85 обуславливает его сепарационные возможности в данных условиях. При низком pH среды эффективным инструментом управления удерживанием анионов и слабых кислот является изменение концентрации элюирующего иона, тогда как разделение положительно заряженных веществ невозможно.

Варьирование концентрации при w_pH 5.76. Рассматривая электростатические взаимодействия при w_pH 5.76 (s_pH 9.2), следует принимать во внимание не только постоянные заряды четвертичного азота и сульфогрупп в функциональном цвиттер-ионном слое сорбента, но и возникающий отрицательный заряд за счёт диссоциации карбоксильных групп во внешнем функциональном слое. Кроме того, часть аминогрупп меньшей степени замещения может депротонироваться, включая внутренние группы в гиперразветвленном слое и непрореагировавшие аминогруппы матрицы. Стоит также учитывать возможное влияние остаточных силанольных групп, константа кислотности w_pK_a которых находится в диапазоне от 4 до 7 [22]. Однако, несмотря на предполагаемую компенсацию положительного заряда, на полученном цвиттер-ионном сорбенте при данном pH катионы практически не удерживались, что свидетельствовало об их электростатическом отталкивании (рис. 2Б).

Для анионов сульфокислот в данных условиях по аналогии с w_pH 2.85 наблюдали увеличение факторов удерживания с уменьшением концентрации ацетат-иона в подвижной фазе. Однако при w_pH 5.76 вклад ионного обмена составил 70% для концентрации 2.5 мМ ЭИ в элюенте (рис. 3),

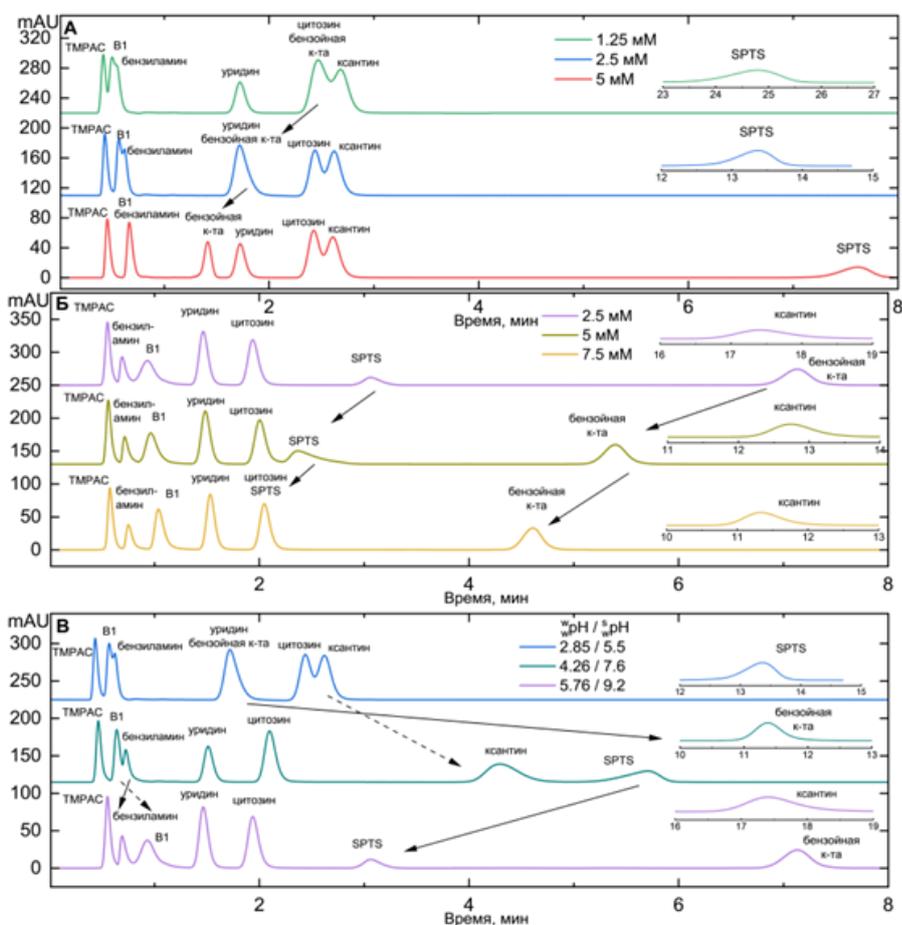


Рис. 4. Хроматограммы модельной смеси соединений (табл. 2): А) при w_{pH} 2.85 в диапазоне концентраций элюирующего иона 1.25-5 мМ; Б) при w_{pH} 5.76 в диапазоне концентраций элюирующего иона 2.5-7.5 мМ; В) в диапазоне значений w_{pH} 2.85-5.76 (s_{pH} 5.5-9.2) при концентрации элюирующего иона 2.5 мМ. Все концентрации относятся к подвижной фазе. Остальные условия приведены в подписи к рис. 2.

Fig. 4. Chromatograms of the model mixture of compounds (Table 2): A) at w_{pH} 2.85 in the range of eluting ion concentrations 1.25-5 mM; B) at w_{pH} 5.76 in the range of eluting ion concentrations 2.5-7.5 mM; C) in the range of w_{pH} 2.85-5.76 (s_{pH} 5.5-9.2) at eluting ion concentration 2.5 mM. All concentrations belong to the mobile phase. Other conditions are presented in the Fig. 2 caption

что, вероятно, вызвано частичным экранированием положительного заряда отрицательно заряженными карбокси-,сульфо- и, возможно, силанольными группами, а также уменьшением количества протонированных первичных, вторичных и третичных аминогрупп. Аналогичный тренд был получен для бензойной кислоты и ксантина, при этом вклад ионного обмена был более близок к таковому для анионов по сравнению с w_{pH} 2.85 (рис. 3). Данные наблюдения свидетель-

ствовали о нахождении веществ в диссоциированной форме. Для бензойной кислоты это согласовалось с её константами кислотности как в водной, так и в водно-органической среде (табл. 1). Однако для ксантина величина w_{pK_a} составляет 7.60, его диссоциация при w_{pH} 5.76 водного буферного раствора теоретически не ожидается, а величина s_{pK_a} на данный момент не установлена. Полученные результаты выявляют неочевидные смещения положений равновесия в водно-орга-

нической среде и позволяют лучше прогнозировать условия разделения веществ разных классов в одном анализе. Кроме того, необходимо отметить, что факторы удерживания бензоата и ксантина были значительно выше факторов, полученных для сульфокислот, что не согласовалось с величинами параметра Ханша для данных веществ (табл. 1). Вероятно, подобное отклонение вызвано вкладом иных адсорбционных взаимодействий в удерживание бензойной кислоты и ксантина. Для нейтральных соединений при w_pH 5.76 сохранилась аналогичная тенденция незначительного ослабления удерживания с уменьшением концентрации буферного раствора в элюенте, вызванное утончением приповерхностного водного слоя [17].

В данных условиях наблюдали иную зависимость эффективности пиков от концентрации. Для анионов получено существенное увеличение эффективности с 3000 до 14 000 тт/м и улучшение симметрии пиков при возрастании концентрации ЭИ в подвижной фазе (табл. 3). Подобное изменение хроматографических параметров связано с экранированием заряда сорбента и уменьшением вклада ионного обмена в удерживание этих аналитов. Для диссоциированных в данных условиях бензойной кислоты и ксантина получена обратная зависимость: при 2.5 мМ ЭИ эффективность достигала наибольших значений – 30 000 и 24 000 тт/м соответственно. Для нейтральных соединений значимого изменения эффективности не наблюдали.

При разделении модельной смеси в данных условиях при варьировании концентрации удалось полностью разрешить пики цитозина и аниона SPTS за счет увеличения вклада ионного обмена в удерживание последнего (рис. 4Б). Полное разрешение восьми соединений разной гидрофильности и заряда при приемлемой эффективности и асимметрии пиков достигнуто за 14 минут при использовании подвижной фазы, содержащей 5 мМ

ацетат-иона. Таким образом, за счёт меньшей анионообменной способности неподвижной фазы при w_pH 5.76 элюента удалось обеспечить большее удерживание и высокую селективность разделения положительно заряженных аналитов, а также существенно снизить времена выхода анионов. Кроме того, при данной кислотности подвижной фазы стало возможным управление удерживанием не только аналитов с фиксированным зарядом, но и дополнительно слабых кислот различной силы.

Варьирование pH. При варьировании w_pH в диапазоне 2.85-5.76 могут происходить изменения степени диссоциации некоторых групп цвиттер-ионного сорбента (карбоксильных, силанольных и аминок групп) и анализируемых соединений, значения pK_a которых соответствуют данной области кислотности. Переход веществ из нейтрального состояния в заряженное влияет на характер их взаимодействия с неподвижной фазой и, как результат, изменяется их удерживание и селективность разделения.

С увеличением pH подвижной фазы наблюдали постоянное снижение факторов удерживания анионов SPTS и SPSS, что может быть связано с повышением эффективного отрицательного заряда в функциональном слое сорбента, вызванного диссоциацией карбоксильных и остаточных силанольных групп, а также снижением числа протонированных аминок групп (рис. 2В). Аналогичные выводы также следовали из зависимости фактора удерживания гидрофильного катиона тиамина от w_pH . Отмеченное уменьшение факторов удерживания анионов было практически полностью вызвано сокращением вклада ионного обмена в их удерживание с 90 до 70% (рис.3, табл. 2). При этом наблюдали незначительное снижение удерживания за счет неэлектростатических взаимодействий для анионов $k'_{ГИХ}$ (табл. 2), по величине близкое к таковому для нейтральных соединений (рис. 2В), что, вероятно, было вызвано

снижением толщины приповерхностного водного слоя сорбента, принимающего непосредственное участие в механизме распределения, и возможным изменением адсорбционных взаимодействий. Стоит отметить, что для исходной матрицы 3-аминопропилсиликагеля снижение вклада ионного обмена в удерживание анионов при переходе от w_pH 2.85 к 5.76 составило менее 10%. Поскольку для цвиттер-ионного сорбента вклад уменьшился значительно, то можно предположить, что это связано не только со снижением доли протонированных аминокрупп и ростом доли диссоциированных силанолов, как в случае исходной матрицы. Существенное влияние оказало возрастание величины отрицательного заряда на его поверхности, вызванное диссоциацией карбоксильных групп функционального слоя.

Для бензойной кислоты зависимость фактора удерживания от рН проходила через максимум, при этом вклад ионного обмена в её удерживание при переходе от w_pH 2.85 к 5.76 сохранялся на одном уровне. При w_pH 2.85 подвижной фазы кислота была слабо диссоциирована, а при w_pH 4.26 ионизация приводила к увеличению её гидрофильности и электростатического притяжения к неподвижной фазе, что одновременно вносило вклад в возрастание фактора удерживания. При последующем увеличении w_pH наблюдали тенденцию, аналогичную таковой для анионов. Однако, механизм удерживания бензойной кислоты и сульфонов отличается. Путём сравнения величин факторов удерживания бензойной кислоты за счёт ионного обмена и неэлектростатических взаимодействий (распределения и адсорбции) при w_pH 2.85 и 5.76 установили, что увеличение удерживания в равной степени вызвано изменением силы взаимодействий электростатической и неэлектростатической природы: $\Delta k'_{IEH}/\Delta k' = 50\%$ (табл. 2). В случае ксантина, который является более слабой кис-

лотой, чем бензойная, наблюдали возрастание вклада ионного обмена в его удерживание от 0 до 50% в диапазоне w_pH 2.85-5.76, при этом увеличение фактора удерживания было на 60% вызвано усилением взаимодействий электростатической природы (рис.3, табл. 2). Уменьшение удерживания ксантина, характерное для других анионов, в рассматриваемом диапазоне рН не наблюдали, что, вероятно, вызвано преобладанием гидрофильных взаимодействий, вызванных увеличением степени диссоциации молекулы аналита. Можно предположить, что дальнейшее возрастание рН приведёт к изменению тренда для фактора удерживания ксантина. Однако максимально допустимое рабочее значение рН для сорбентов на основе силикагеля составляет 7-8.

Для анионов и слабых кислот, факторы удерживания которых на данной колонке в наибольшей степени зависят от рН, отмечено увеличение эффективности при возрастании факторов их удерживания. Наилучшие значения хроматографических параметров для анионов и нейтральных соединений получены при w_pH 2.85 подвижной фазы (табл. 3).

Катионы, содержащие гидрофобные фрагменты в структуре, как было показано выше, не удерживаются в рассматриваемых условиях, что вызвано преобладанием анионообменных свойств цвиттер-ионной неподвижной фазы. Слабое основание бензиламин имело низкий фактор удерживания во всем диапазоне рН, наибольшее значение которого было получено при w_pH 4.26. По-видимому, на характере его взаимодействий с неподвижной фазой также сказывалось изменение эффективного заряда сорбента и собственной степени диссоциации.

На хроматограммах модельных смесей при разных значениях w_pH и одинаковой концентрации элюирующего иона, равной 2.5 мМ в подвижной фазе, продемонстрировано, как влияет изменение заряда аналита и функциональных групп сор-

бента на селективность разделения и разрешение пиков (рис. 3В). При w_pH 2.85 не удалось разделить пары цитозин-ксантин и уридин-бензойная кислота из-за схожего удерживания нейтральных соединений и практически недиссоциированных слабых кислот, а также пару тиамин-бензиламин, элюирующуюся вблизи мёртвого времени вследствие одинакового заряда и значительного отталкивания от функционального слоя сорбента. При повышении w_pH в соответствии с процессами, подробно рассмотренными выше, происходило улучшение селективности разделения. Так, при w_pH 4.26 нейтральные и отрицательно заряженные компоненты смеси разделялись до базовой линии за 12 мин с эффективностью от 12000 до 22000 тт/м и хорошей симметрией пиков. Разрешения слабоудерживаемых бензиламина и тиамина удалось добиться при w_pH 5.76 благодаря меньшему отталкиванию от положительно заряженных центров сорбента, что позволило провести анализ модельной смеси соединений разных классов за 19 мин.

Таким образом, варьирование кислотности и концентрации буферного раствора в подвижной фазе являются важными инструментами для обеспечения высокой эффективности и селективности разделения многокомпонентных смесей, содержащих вещества различных кислотно-основных свойств, на гиперразветвленной цвиттер-ионной колонке в режиме гидрофильной хроматографии.

Заключение

В работе получен новый цвиттер-ионный сорбент на основе силикагеля с гиперразветвленным функциональным слоем, во внутреннем слое которого со-

держались сильнокислотные сульфогруппы, во внешнем – карбоксильные, сформированные с использованием иминодиуксусной кислоты.

Состав подвижной фазы, а именно, показатель кислотности и концентрация элюирующего иона, являются ключевыми факторами влияния на удерживание и, как следствие, селективность разделения соединений различной природы в режиме гидрофильной хроматографии. Именно с помощью варьирования данных параметров необходимо проводить детальное описание свойств сорбента и его возможных взаимодействий с определяемыми соединениями. В диапазоне w_pH 2.85-5.76 на синтезированной цвиттер-ионной неподвижной фазе обнаружено уменьшение удерживания органических анионов, вызванное преимущественно взаимодействиями электростатического характера, что позволило установить зависимость ионообменных свойств сорбента от pH. Изменение удерживания слабых кислот зависело от их w_pK_a , однако оно в первую очередь объяснялось ростом их собственной степени диссоциации при увеличении pH среды. Независимое варьирование w_pH и концентрации элюирующего иона в подвижной фазе позволило детальнее рассмотреть возникающие эффекты изменения селективности и добиться полного разделения модельной смеси соединений разных классов.

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. Hemström P., Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 2006; 29(12): 1784-1821.

2. Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 402(1): 231.

3. Guo Y., Gaiki S. Retention and selectivity of stationary phases for



- hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218(35): 5920-5938.
4. Qiu J., Craven C., Wawryk N., Carroll K., Li X.-F. Integration of solid phase extraction with HILIC-MS/MS for analysis of free amino acids in source water. *J. Environ. Sci.* 2022; 117: 190-196.
5. Soukup J., Jandera P. Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2014; 1374: 102-111.
6. Chirita R.I., West C., Zubrzycki S., Finaru A.-L., Elfakir C. Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218(35): 5939-5963.
7. Nesterenko E.P., Nesterenko P.N., Paull B. Zwitterionic ion-exchangers in ion chromatography: A review of recent developments *Anal. Chim. Acta.* 2009; 652(1-2): 3-21.
8. Chen D., Shi F., Zhou Y., Xu W., Shen H., Zhu Y. Hyperbranched anion exchangers prepared from polyethylene polyamine modified polymeric substrates for ion chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2021; 1655: 462508.
9. Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N. Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218(35): 5903-5919.
10. McCalley D.V. Study of retention and peak shape in hydrophilic interaction chromatography over a wide pH range. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1411: 41-49.
11. McCalley D.V. A study of the analysis of acidic solutes by hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2018; 1534: 64-74.
12. McCalley D.V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J. Chromatogr. A.* 2007; 1171: 46-55.
13. McCalley D.V. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2010; 1217(20): 3408-3417.
14. Iverson C.D., Gu X., Lucy C.A. The hydrophilicity vs. ion interaction selectivity plot revisited: The effect of mobile phase pH and buffer concentration on hydrophilic interaction liquid chromatography selectivity behavior. *J. Chromatogr. A.* 2016; 1458: 82-89.
15. Alvarez-Segura T., Subirats X., Rosés M. Retention-pH profiles of acids and bases in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 2019; 1050: 176-184.
16. Jovanović M., Stojanović B.J. Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2013; 1301: 27-37.
17. Guo Y., Bhalodia N., Fattal B., Serriset I. Evaluating the adsorbed water layer on polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Separations.* 2019; 6(2): 19.
18. Subirats X., Rosés M., Bosch E. On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pKa of analytes – A review. *Separation and Purification Reviews.* 2007; 36(3): 231-255.
19. Cox G.B., Stout R.W. Study of the retention mechanism for basic compounds on silica under “pseudo-reversed-phase” conditions. *J. Chromatogr. A.* 1987; 384: 315-336.
20. Greco G., Grosse S., Letzel T. Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids. *J. Chromatogr. A.* 2012; 1235: 60-67.



21. Subirats X., Casanovas L., Redón L., Rosés M. Effect of the solvent on the chromatographic selectivity in reversed-phase and HILIC. *Adv. Sample Prep.* 2023; 6: 100063.

22. Kumar A., Heaton J.C., McCalley D.V. Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2013; 1276: 33-46.

Информация об авторах / Information about the authors

Г.С. Максимов – студент, техн. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

А.О. Шемякина – аспирант, м.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

А.С. Ужель – к.х.н., с.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

А.В. Чернобровкина – к.х.н., доцент, кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

G.S. Maksimov – student, technician, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

A.O. Shemiakina – the postgraduate student, Junior Researcher, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

A.S. Uzhel – Senior Researcher, Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

A.V. Chernobrovkina – associate prof., Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, E-mail: chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru

Статья поступила в редакцию 24.04.2024; одобрена после рецензирования 14.06.2024; принята к публикации 19.06.2024.

The article was submitted 24.04.2024; approved after reviewing 14.06.2024; accepted for publication 19.06.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 541.183

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12235

Хемосорбция водорода на оксидах металлов с добавками оксида палладия (II)

**Алексей Владимирович Шапошник^{1✉}, Алексей Алексеевич Звягин¹,
Олеся Анатольевна Арефьева², Станислав Викторович Рябцев³,
Ольга Вячеславовна Дьяконова¹, Алексей Андреевич Васильев⁴**

¹Воронежский государственный аграрный университет, Воронеж, Россия, a.v.shaposhnik@gmail.com[✉]

²НПО «Прибор», Санкт-Петербург, Россия

³Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

⁴Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

Аннотация. Хемосорбция может привести к изменению электропроводности, что позволяет применять полупроводниковые материалы для создания газовых сенсоров. С другой стороны, полупроводниковые сенсоры могут быть использованы как устройства для исследования хемосорбции газов. В данной работе было поставлено две задачи. Первая из них – создание сенсора для селективного определения водорода в воздухе, в том числе, в смеси с другими газами. Вторая задача – определение механизма хемосорбции водорода на поверхности оксидов металлов с добавками оксида палладия (II).

Получены и охарактеризованы нанодисперсные материалы на основе SnO₂ и WO₃ с добавками 3 % PdO по массе. Проведено сравнение электрофизических характеристик этих материалов в стационарных температурных режимах, а также при температурной модуляции в присутствии водорода, метана и их смесей. Определены особенности хемосорбции водорода на поверхности металлоксидных полупроводников на основе SnO₂ и WO₃ с добавками PdO в режиме температурной модуляции сенсора. Показано, что экстремумы на зависимости электропроводности сенсора от температуры можно объяснить вкладом переноса протонов в общую электрическую проводимость.

Наличие экстремумов электропроводности сенсоров, которые наблюдаются в режиме термомодуляции в присутствии водорода, позволяет проводить качественный и количественный анализ не только однокомпонентных газовых систем, но также смесей водорода с другими газами-аналитами. В частности, в данной работе была показана возможность определения состава смеси водород-метан в воздухе с помощью единичного металлоксидного сенсора. Преимуществом данного подхода является простота обработки массивов многомерных данных.

Ключевые слова: хемосорбция водорода, хемосорбция кислорода, металлоксидные сенсоры, селективный анализ

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-23-00329).

Для цитирования: Шапошник А.В., Звягин А.А., Арефьева О.А., Рябцев С.В., Дьяконова О.В., Васильев А.А. Хемосорбция водорода на оксидах металлов с добавками оксида палладия (II) // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 321-334. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12235>

Original article

Chemisorption of hydrogen on metal oxides with palladium (II) oxide additives

**Alexey V. Shaposhnik^{1✉}, Alexey A. Zvyagin¹, Olesya A. Arefieva²,
Stanislav V. Ryabtsev³, Olga V. Dyakonova¹, Alexey A. Vasilyev⁴**

¹Voronezh State Agrarian University, Voronezh, Russia, a.v.shaposhnik@gmail.com[✉]

²NPO Pribor, St. Petersburg, Russia

³Voronezh State University, Voronezh, Russia

⁴Dubna State University, Dubna, Russia

Abstract. Chemisorption can lead to a change in electrical conductivity, which allows using semiconductor materials to create gas sensors. On the other hand, semiconductor sensors can be used as devices for studying the chemisorption of gases. In this work, we set two tasks. The first of them was to create a sensor for the selective determination of hydrogen in air, including in a mixture with other gases. The second task was to determine the mechanism of hydrogen chemisorption on the surface of metal oxides with palladium (II) oxide additives. We obtained and characterised nanodispersed materials based on SnO₂ and WO₃ with additions of 3% PdO by weight. We compared the electrical characteristics of these materials in stationary temperature conditions as well as with temperature modulation in the presence of hydrogen, methane, and their mixtures. The specific features of hydrogen chemisorption were determined on the surface of metal oxide semiconductors based on SnO₂ and WO₃ with PdO additives in the temperature modulation mode of the sensor. It was shown that the extrema in the dependence of the sensor's electrical conductivity on temperature can be explained by the contribution of proton transfer to the total electrical conductivity.

The presence of extrema in the electrical conductivity of sensors, which were observed in thermal modulation mode in the presence of hydrogen, allows conducting qualitative and quantitative analysis of not only single-component gas systems, but also of mixtures of hydrogen with other analyte gases. In particular, this work demonstrated that it was possible to determine the composition of a hydrogen-methane mixture in air using a single metal oxide sensor. The advantage of this approach is that multidimensional data arrays can be easily processed.

Keywords: hydrogen chemisorption, oxygen chemisorption, metal oxide sensors, selective analysis

Acknowledgments: the study was supported by the Russian Science Foundation grant (project No. 23-23-00329).

For citation: Shaposhnik A.V., Zvyagin A.A., Arefieva O.A., Ryabtsev S.V., Dyakonova O.V., Vasilyev A.A. Chemisorption of hydrogen on metal oxides with palladium (II) oxide additives. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 321-334. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12235>

Введение

В последние десятилетия в мире много внимания уделяется развитию водородной энергетики, однако производство водорода увеличивается недостаточно быстрыми темпами. Это связано, в частности, со взрывоопасным характером смеси водорода с кислородом воздуха, с необходимостью непрерывного поиска возможных утечек и контролирования концентрации водорода в воздухе. Решение этих проблем связано с созданием водородных сенсоров нового поколения, сочетающих высокую чувствительность с высокой селективностью. Кроме того, водородные сенсоры должны потреблять мало энергии, чтобы обладать способностью работать автономно длительное время в труднодоступных местах.

В настоящее время для определения в воздухе водорода часто используются пеллисторы, катарометры, акустические и электрохимические сенсоры, однако каждое из этих устройств имеет свои не-

достатки [1]. Например, пеллисторы, катарометры и акустические сенсоры не отличаются высокой чувствительностью, и поэтому не способны определять низкие концентрации водорода, а недостатком электрохимических сенсоров является необходимость восстановления состава реагента (электролита). Более перспективным считается применение кондуктометрических сенсоров, однако их разработка связана с синтезом новых полупроводниковых наноматериалов, обладающих высокой хемосорбционной активностью.

Наиболее популярным методом получения газочувствительных материалов является синтез наночастиц и их последующее спекание – в этом случае образуются относительно толстые покрытия с развитой поверхностью. Кроме того, часто применяют магнетронное напыление тонких пленок. Обычно используются оксиды металлов с каталитическими добавками, такими, как палладий или платина.



Высокая чувствительность и стабильность были достигнуты при использовании материалов на основе SnO_2 [2-10]. Сенсоры на основе SnO_2 с добавками палладия в виде оксида широко используются на практике.

В последние годы большой интерес вызывают методы синтеза газочувствительных наноматериалов на основе WO_3 . Эти материалы показывают высокую чувствительность по отношению к водороду [11-22]. Кроме того, для создания сенсоров водорода синтезируются наноматериалы на основе ZnO [23-28], на основе TiO_2 [29-32], а также In_2O_3 [33], NiO [34], Nb_2O_5 [35] и других оксидов металлов.

Наряду с методом синтеза наноматериалов, основанном на слипании квази-0-мерных частиц, в качестве газочувствительных материалов используются квази-1-мерные материалы (nanowires, nanorods, nanofibers) [14, 21, 30, 36-39]. В качестве сенсоров могут быть использованы единичные нанонити [40].

В последние годы возрос интерес к исследованию сенсорных свойств квази-2-мерных материалов, таких, как графен [41-46], а также к материалам на основе нанотрубок [47].

Повышение селективности водородных сенсоров может быть достигнуто нанесением на поверхность газочувствительного материала мембранных покрытий [15, 26, 48-53]. Повышение селективности в этом случае достигается благодаря высокой диффузионной проницаемостью водорода. Селективность определения водорода может быть также значительно повышена благодаря модуляции потенциального барьера в гетеропереходах [54]. Еще одно направление для повышения селективности определения водорода с помощью сенсоров – использование sensor array («электронного носа») [38] или применение температурной модуляции сенсора [55-57]. Температурная модуляция позволяет в значительной степени разделить процессы хемосорбции

водорода и его химического взаимодействия с хемосорбированным кислородом. В результате данный подход позволяет выявить индивидуальные особенности водорода и повысить селективность анализа.

Температурная модуляция позволяет повысить не только селективность определения водорода, но также чувствительность. Правильный подбор температурного режима позволяет повысить чувствительность сенсора на два порядка и больше [56]. Еще одним преимуществом температурной модуляции является возможность снижения расходов электроэнергии – сенсор нагревается не все время, а только в течение отдельных тепловых импульсов. Другим направлением снижения расходов электроэнергии является использование room temperature sensors [8, 18]. Однако room temperature sensors пока не могут конкурировать с сенсорами, работающими при высоких температурах, ни по чувствительности, ни по селективности.

Повышение селективности анализа, которое достигается использованием «электронного носа» или температурной модуляции сенсора, не следует путать с повышением селективности самого сенсора. Высокоселективные сенсоры встречаются редко, однако использование температурной модуляции позволяет проводить селективный анализ даже при использовании малоселективных сенсоров. Однако в этом случае применяют специальные методы обработки многомерных данных, например, principal component analysis (PCA) [56] или искусственные нейронные сети [55]. Несмотря на достигнутые успехи, оба подхода имеют недостатки, связанные с необходимостью использования относительно сложных программных ресурсов, которые приходится реализовывать на основе компьютерного процессора. Однако актуальная задача создания недорогих компактных приборов для мониторинга концентрации водорода в труднодоступных местах может

быть решена только на основе относительно недорогого микроконтроллера, ресурс которого не позволяет использовать традиционные методы обработки многомерных данных.

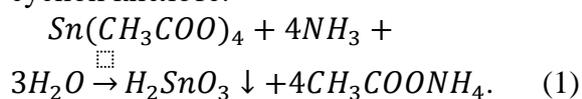
Особенностью водорода и некоторых других анализируемых веществ, способных к реакции дегидрогенизации, является появление дополнительных экстремумов на кривых зависимости электрического сопротивления сенсора от времени в режиме температурной модуляции. Нахождение координат этих экстремумов открывает путь к селективному определению водорода даже в его смеси с некоторыми другими газами, причем алгоритм поиска этих дополнительных экстремумов не требует больших вычислительных ресурсов и может быть реализован даже на самых простых микроконтроллерах. С другой стороны, вызывает большой интерес выявление природы этих экстремумов, связанных с наличием особых механизмом хемосорбции.

Рассмотренная в нашей работе задача селективного определения водорода в его смеси с метаном может иметь практическое значение, поскольку существуют проекты транспортирования таких смесей на большие расстояния [58].

Экспериментальная часть

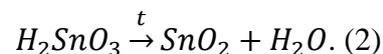
В работе были использованы газочувствительные материалы на основе двух разных высокодисперсных оксидов – SnO_2 и WO_3 . К каждому из этих материалов был добавлен палладий в виде двухвалентного оксида.

Наночастицы оловянной кислоты получали добавлением концентрированного раствора аммиака к охлажденному раствору ацетата олова (+4) в ледяной уксусной кислоте:



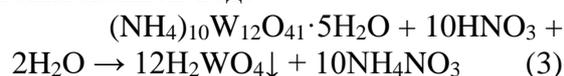
Оловянную кислоту отделяли центрифугированием, промывали деионизированной водой, просушивали и

прокаливали до $500^\circ C$, что приводило к образованию нанопорошка диоксида олова:

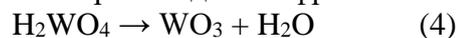


Состав и структура нанопорошка SnO_2 были охарактеризованы рентгеновским фазовым анализом, просвечивающей электронной микроскопией и фотоэлектронной спектроскопией [40, 59]. Как следует из полученных результатов, размер кристаллитов составляет примерно 3 нм, а размер частиц порошка 5-7 нм. Частицы имеют сложную структуру, то есть, состоят из ядра и оболочки.

Наночастицы вольфрамовой кислоты получали при добавлении 3М HNO_3 к раствору паравольфрамата аммония в деионизированной воде:



Осадок вольфрамовой кислоты отделяли центрифугированием, промывали его деионизированной водой, высушивали и прокаливали при температуре $500^\circ C$, что приводило к образованию нанопорошка триоксида вольфрама:



Характеризация нанопорошка триоксида вольфрама проведена с помощью просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновского фазового анализа [60]. Как следует из данных электронной микроскопии, размер зерен составляет 10-20 нм. Установлено, что образец соответствует триклинной фазе WO_3 .

К нанопорошкам диоксида олова и триоксида вольфрама добавляли нитрат тетраамминпалладия (+2). К полученным смесям добавляли раствор метил-целлозольва в терпениоле. Полученную пасту наносили на диэлектрические подложки из оксида алюминия, содержащие платиновые электроды и платиновый нагреватель. Подложки с нанесенными на них тонким слоем пастами толщиной около 10 мкм нагревалась до температуры $700-750^\circ C$, в результате чего происходило формирование высокодисперсных хрупких гелей. Палладий, содержащийся в

комплексном соединении, превращался в оксид PdO. После формирования газочувствительных слоев сенсоры припаивали к корпусам.

Для исследования сенсорных свойств полученных материалов использовали поверочные газовые смеси «водород в синтетическом воздухе» с концентрацией 200 ppm и «метан в синтетическом воздухе» с концентрацией 2%, которые разбавляли синтетическим воздухом. Кроме того, были использованы поверочные газовые смеси с концентрацией водорода 200 ppm, отличающиеся концентрацией кислорода. В одной из них она составляла 2% (остальное – азот и водород), в другой 20% (водород в синтетическом воздухе), в третьей – 99.98% (водород в кислороде).

Сенсор, находящийся в металлическом корпусе ТО-8, был помещен в камеру из нержавеющей стали. Температуру газочувствительного материала устанавливали с помощью специального

электронного устройства на основе полученного в предварительных измерениях температурного коэффициента сопротивления нагревателя сенсора.

Измерения проводили как при постоянной температуре, так и при температурной модуляции – в этом случае длительность каждого цикла составляла 15 секунд, из которых 2 секунды продолжался нагрев от 100 до 450°C, а следующие 13 секунд – охлаждение от 450 до 100°C. Циклы нагрев-охлаждение следовали друг за другом без перерыва (рис. 1).

Отклик S вычисляли как отношение электрической проводимости газочувствительного слоя G_g в исследуемом газе (водороде) к электрической проводимости G_0 в синтетическом воздухе (смеси азота и кислорода):

$$S = G_g / G_0. \quad (5)$$

Обсуждение результатов

На рис. 2 представлены зависимости откликов сенсоров SnO₂-PdO (кривая 1) и

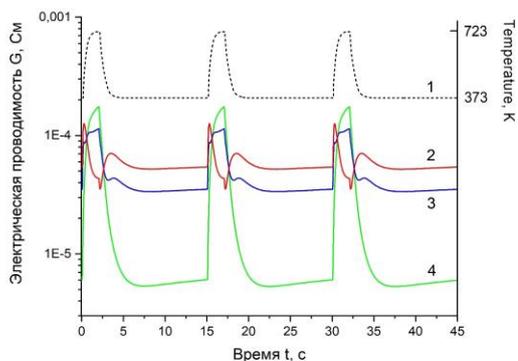


Рис. 1. Зависимость температуры сенсора SnO₂-PdO от времени (кривая 1) и электрической проводимости от времени на протяжении трех измерительных циклов. Кривая 2 – 100 ppm H₂, кривая 3 – смесь 50 ppm H₂ и 5000 ppm CH₄, кривая 4 – 10000 ppm CH₄.

Fig. 1. Dependence of the temperature of the SnO₂-PdO sensor on time (curve 1) and of electrical conductivity on time over three measurement cycles. Curve 2 – 100 ppm H₂, curve 3 – mixture 50 ppm H₂ and 5000 ppm CH₄, curve 4 – 10000 ppm CH₄.

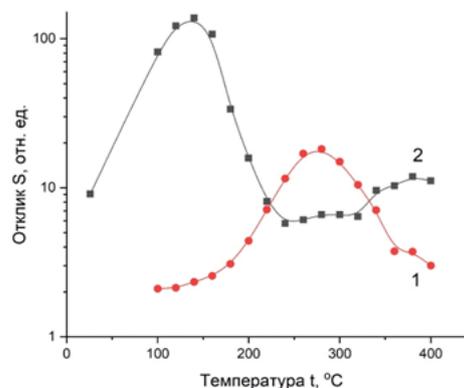


Рис. 2. Зависимость откликов сенсоров SnO₂-PdO (кривая 1) и WO₃-PdO (кривая 2) по отношению к 200 ppm H₂ от температуры, полученная в стационарных режимах

Fig. 2. Dependence of the responses of the SnO₂-PdO sensors (curve 1) and WO₃-PdO (curve 2) in relation to 200 ppm H₂ on the temperature obtained in stationary modes.

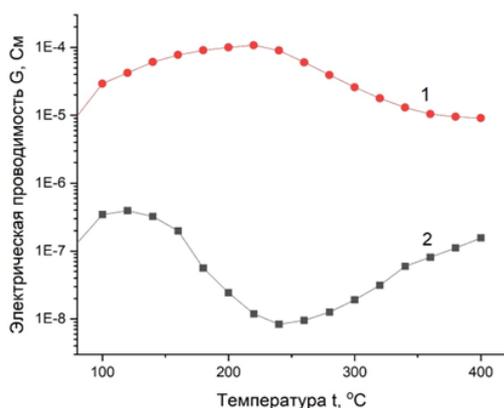


Рис. 3. Электрическая проводимость сенсоров SnO₂-PdO (кривая 1) и WO₃-PdO (кривая 2) в 200 ppm H₂ при различных стационарных температурах

Fig. 3. Electrical conductivity of the responses of the SnO₂-PdO sensors (curve 1) and WO₃-PdO (curve 2) in 200 ppm H₂ at various stationary temperatures

WO₃-PdO (кривая 2) от температуры, полученные в стационарных режимах при определении 200 ppm водорода по формуле 5. Как и следовало ожидать, характер температурной зависимости существенно отличается, поскольку газочувствительные материалы имеют разную природу. Максимальной чувствительности сенсор SnO₂-PdO достигает при 280°C, что же касается сенсора WO₃-PdO, то у него наблюдаются два максимума чувствительности – один при температуре 140°C, а другой при температуре 370°C. Существенно отличается также и зависимость электрической проводимости сенсора SnO₂-PdO от температуры при концентрации водорода 200 ppm (кривая 1 на рис. 3), от соответствующей зависимости электрической проводимости сенсора WO₃-PdO (кривая 1 на рис. 3), что также объясняется различием природы полупроводниковых материалов.

Сенсорный отклик при определении газа-восстановителя (водорода) полупроводником n-типа имеет донорный характер, то есть, приводит к увеличению концентрации носителей заряда (электронов)

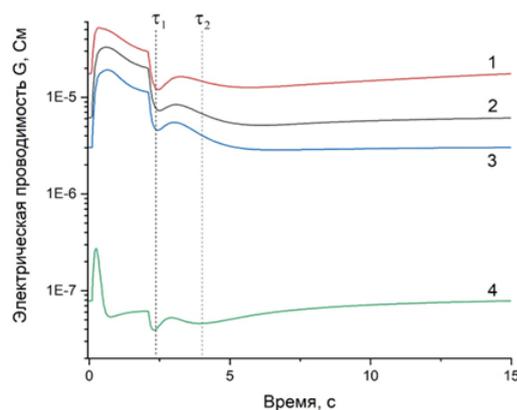


Рис. 4. Зависимость электрической проводимости сенсора SnO₂-PdO (кривые 1-3) и сенсора WO₃-PdO (кривая 4) от времени на протяжении одного измерительного цикла температурной модуляции (пояснения в тексте).

Fig. 4. Dependence of the electrical conductivity of the SnO₂-PdO sensor (curves 1-3) and the WO₃-PdO sensor (curve 4) on time during one measuring cycle of temperature modulation (explained in the text).

и электрической проводимости. Взаимодействие определяемых газов с полупроводниковым материалом в воздушной среде обычно протекает с участием хемосорбированного кислорода, который находится на поверхности в виде анионов O₂⁻, O⁻ и O²⁻ [61]. Один из наиболее вероятных каналов взаимодействия водорода с полупроводником можно представить в виде схемы:



В результате взаимодействия водорода с анионами кислорода увеличивается концентрация электронов в полупроводнике, соответствующее увеличение электропроводности является аналитическим сигналом сенсора.

Переход от стационарных режимов (рис. 2-3) к температурной модуляции сенсора позволяет значительно повысить как чувствительность сенсора, так и селективность всего анализа [56], однако природа хемосорбционных и химических процессов на поверхности металлоксидного полупроводника в этом случае может иметь особенности, которые пока еще мало исследованы [62].

На рисунке 1 показаны зависимости температуры от времени (кривая 1), а также электрической проводимости от времени на протяжении трех циклов «нагрев-охлаждение» для сенсора SnO₂-PdO. Кривая 1 показывает изменение электрической проводимости сенсора в 100 ppm водорода, кривая 3 – в 1% (10000 ppm) метана, а кривая 2 – в смеси, содержащей 50 ppm водорода и 0.5% метана. Как следует из рисунка 1, характер изменения электрической проводимости сенсора в различных средах существенно отличается, что предоставляет возможность для проведения селективного анализа.

Как показывает уравнение (6), на величину сенсорного отклика должна оказывать значительное влияние концентрация кислорода, поэтому были проведены исследования зависимости электрической проводимости сенсора SnO₂-PdO в газовых средах, имеющих одинаковую концентрацию водорода (200 ppm), но разные концентрации кислорода. Температурная модуляция сенсоров проводилась в том же режиме, как и на рисунке 1 – нагрев от 100 до 450°C проходил за 2 секунды, а охлаждение от 450°C до 100°C продолжалось 13 секунд. Кривая 1 на рисунке 4 показывает изменение электрической проводимости сенсора SnO₂-PdO в газовой среде, содержащей 200 ppm водорода и 2% кислорода (остальное – азот), кривая 2 была получена в среде, содержащей 200 ppm водорода и 20% кислорода (остальное – азот), кривая 3 – в среде, содержащей 200 ppm водорода в чистом кислороде. Как и следовало ожидать, увеличение концентрации кислорода приводило к снижению электропроводности, так как кислород является окислителем и его собственный отклик – акцепторный, то есть, он приводит к снижению концентрации носителей заряда (электронов) в полупроводнике n-типа. Однако следует обратить внимание на характерный максимум электропроводности в промежутке времени между τ_1 и τ_2 , который наблюдается при остывании сенсоров. Положение

этого максимума не зависит ни от концентрации кислорода, ни от природы металлоксидного материала (кривая 4 соответствует сенсору WO₃-PdO). Подобные максимумы на кривых зависимости электрической проводимости сенсора от времени (температуры) наблюдаются только в среде водорода или веществ, способных к дегидрогенизации (этанол) [63]. Таким образом, напрашивается вывод о специфическом характере взаимодействия водорода с поверхностью металлоксидных полупроводников, имеющих добавки оксида палладия.

Известно, что в металлоксидных полупроводниках, например, в SnO₂, возможен ионный (протонный) тип проводимости [64, 65]. Максимум на зависимости электропроводности от времени (температуры) трудно объяснить чем-то другим, кроме появления на поверхности полупроводника катионов водорода:



Таким образом, наряду с обычной электропроводностью оксидов металлов, вызванной движением электронов, дополнительный вклад может вносить и протонная электропроводность.

На кривых зависимости электропроводности сенсора SnO₂-PdO от времени при модуляции температуры при различных концентрациях метана в промежутке времени между τ_1 и τ_2 максимум отсутствует (рис. 5), на соответствующих кривых при различных концентрациях водорода максимум есть (рис. 6), что позволяет проводить качественный анализ газовых сред «водород в воздухе» и «метан в воздухе».

Существуют две задачи селективного определения газов. Первая из них – качественный и количественный анализ условно однокомпонентных систем. В данном случае – это системы «водород в воздухе» и «метан в воздухе». Как показано на рисунках 5 и 6, появление максимума электропроводности сенсора в среде водорода позволяет решить эту задачу. Вторая задача, определение состава

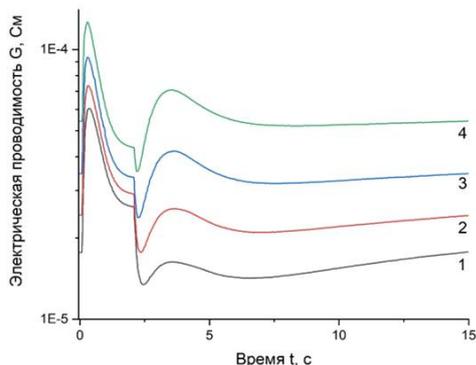


Рис. 5. Зависимость электрического сопротивления сенсора SnO₂-PdO от времени на протяжении одного цикла измерений при изменении температуры от 100 до 450 градусов и обратно: 1 – 20 ppm H₂; 2 – 30 ppm H₂; 3 – 50 ppm H₂; 4 – 100 ppm H₂.

Fig. 5. Dependence of the electrical resistance of the SnO₂-PdO sensor on time during one measurement cycle when the temperature changes from 100 to 450 degrees and back: 1 – 20 ppm H₂; 2 – 30 ppm H₂; 3 – 50 ppm H₂; 4 – 100 ppm H₂.

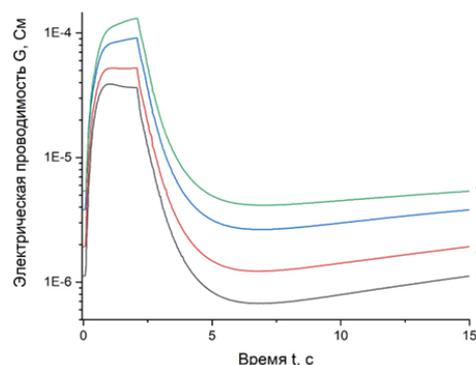


Рис. 6. Зависимость электрического сопротивления сенсора SnO₂-PdO от времени на протяжении одного цикла измерений при изменении температуры от 100 до 450 градусов и обратно: 1 – 500 ppm CH₄; 2 – 1000 ppm CH₄; 3 – 3000 ppm CH₄; 4 – 6000 ppm CH₄.

Fig. 6. Dependence of the electrical resistance of the SnO₂-PdO sensor on time during one measurement cycle when the temperature changes from 100 to 450 degrees and back: 1 – 500 ppm CH₄; 2 – 1000 ppm CH₄; 3 – 3000 ppm CH₄; 4 – 6000 ppm CH₄.

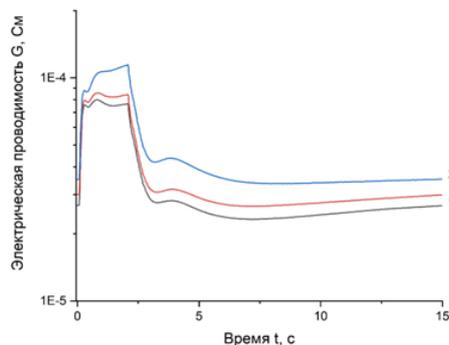


Рис. 7. Зависимость электрического сопротивления сенсора SnO₂-PdO от времени на протяжении одного цикла измерений при изменении температуры от 100 до 450 градусов и обратно: Кривая 1 – 2500 ppm CH₄ + 25 ppm H₂, кривая 2 – 3000 ppm CH₄ + 30 ppm H₂, кривая 3 – 5000 ppm CH₄ + 50ppm H₂.

Fig. 7. Dependence of the electrical resistance of the SnO₂-PdO sensor on time during one measurement cycle when the temperature changes from 100 to 450 degrees and back: Curve 1 – 2500 ppm CH₄ + 25 ppm H₂, curve 2 – 3000 ppm CH₄ + 30 ppm H₂, curve 3 – 5000 ppm CH₄ + 50ppm H₂.

смесей, более трудная. Однако предложенный нами подход позволяет решить и эту задачу при использовании единичного металлоксидного сенсора. Как показано на рисунках 1 и 7, при определении смеси метана и водорода на кривых зависимости электропроводности от времени (температуры) также можно заметить

максимум, причем его положение определяется составом смеси.

Заклучение

Проведение селективного анализа может быть связано с созданием высокоселективных сенсоров, однако они до сих



не созданы, и неизвестно, будут ли созданы в принципе. Другой путь проведения селективного анализа предполагает использование набора нескольких малоселективных сенсоров (sensor array) или даже одного малоселективного сенсора, работающего в нестационарном режиме. В этом случае каждому газу или газовой смеси соответствует набор многомерных данных, формирующий образ данного газа или газовой смеси. Важной проблемой в этом случае является оптимальная обработка массивов многомерных данных.

Актуальное направление разработки сенсоров связано с созданием на их основе компактных недорогих аналитических приборов, способных проводить непрерывный экологический мониторинг в труднодоступных местах. В этом случае необходимо использовать не дорогие компьютерные процессоры, а микроконтроллеры, обладающие ограниченными вычислительными ресурсами. Микроконтроллеры не могут справиться с традиционными средствами обработки массивов многомерных данных, основанными на использовании искусственных нейронных сетей или методов, основанных на редукции размерности данных. Для создания недорогих аналитических приборов, основанных на микроконтроллерах, требуется использовать специальные алгоритмы обработки данных, основанные на исследовании природы взаимодействия аналитов с газочувствительными материалами сенсоров. В данной работе были исследованы механизмы сорбции водорода на газочувствительном металлоксидном материале, выявлены аномалии, которые могут быть использованы для селективного определения водорода не только в условно однокомпонентной системе, но и в смеси с другими газами.

Список литературы/References

1. Hübert T., Boon-brett L., Black G., Banach U., *Sensors and Actuators B: Chemical Hydrogen sensors – A review.*

При низкой температуре поверхности сорбция большая, но катализатор неактивен. При высокой температуре активизируется катализатор, но сорбция существенно уменьшается. Чередование нагрева и охлаждения позволяет в некоторые моменты времени соединить два важных фактора – значительную сорбцию газа и активное состояние катализатора (в первую очередь, оксида палладия). Именно в эти моменты, в начальной фазе охлаждения, были выявлены аномалии на кривых зависимости электропроводности от времени (температуры), которые явились предметом нашего исследования. Было показано, что наиболее вероятным объяснением этих дополнительных экстремумов при определении водорода в воздухе является вклад протонного механизма электропроводности наряду с обычным, электронным.

Наличие на кривых характерных экстремумов, связанных с сорбцией водорода, позволяет легко и эффективно обрабатывать многомерные данные, для этого достаточно найти координаты экстремумов. С этой вычислительной операцией легко справится даже недорогой микроконтроллер. Таким образом, открывается возможность создания недорогих компактных анализаторов водорода, способных работать автономно в течение длительного времени.

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.

Sensors and Actuators B. 2011; 157: 329-352.

2. Qiu T., Zhou S., Ji J., Wu G., Yan W., Ling M., Liang C., High performance H₂ sensor based on rGO-wrapped SnO₂-Pd

- porous hollow spheres. *Ceram. Int.* 2022; 48(11): 15056-15063.
3. Meng X., Bi M., Xiao Q., Gao W., Ultra-fast response and highly selectivity hydrogen gas sensor based on Pd/SnO₂ nanoparticles. *Int. J. Hydrogen Energy. Hydrogen Energy Publications LLC.* 2022; 47(5): 3157-3169.
 4. Oprea A., Moretton E., Bârsan N., Becker W.J., Wöllenstein J., Weimar U., Conduction model of SnO₂ thin films based on conductance and Hall effect measurements. *J. Appl. Phys.* 2006; 100(3): 033716.
 5. Liewhiran C., Tamaekong N., Wisitsoraat A., Tuantranont A., Phanichphant S., Ultra-sensitive H₂+ sensors based on flame-spray-made Pd-loaded SnO₂+ sensing films. *Sensors Actuators, B Chem.* 2013; 176(2): 893-905.
 6. Zhang S., Yin C., Yang L., Zhang Z., Han Z., Sensors and Actuators B : Chemical Investigation of the H₂ sensing properties of multilayer mesoporous pure and Pd-doped SnO₂ thin film. *Sensors Actuators B. Chem.* 2019; 283: 399-406.
 7. Luo N., Wang C., Zhang D., Guo M., Wang X., Cheng Z., Xu J., Sensors and Actuators B. Chemical Ultralow detection limit MEMS hydrogen sensor based on SnO₂ with oxygen vacancies. *Sensors Actuators B. Chem.* 2022; 354: 130982.
 8. Meng X., Bi M., Gao W. Rapid response hydrogen sensor based on Pd@Pt/SnO₂ hybrids at near-ambient temperature. *Sensors Actuators B Chem.* 2022; 370: 132406.
 9. Inyawilert K., Wisitsoraat A., Tuantranont A., Phanichphant S., Liewhiran C., Sensors and Actuators B : Chemical Ultra-sensitive and highly selective H₂ sensors based on FSP-made Rh-substituted SnO₂ sensing films. *Sensors Actuators B. Chem.* 2017; 240: 1141-1152.
 10. Motaung D.E., Mhlongo G.H., Makgwane P.R., Dhonge B.P., Cummings F.R., Swart H.C., Sinha S., Sensors and Actuators B : Chemical Ultra-high sensitive and selective H₂ gas sensor manifested by interface of n – n heterostructure of CeO₂ - SnO₂ nanoparticles. *Sensors Actuators B. Chem.* 2018; 254: 984-995.
 11. Cai L., Zhu S., Wu G., Jiao F., Li W., Wang X., An Y., Hu Y., Sun J., Dong X., Highly sensitive H₂ sensor based on PdO-decorated WO₃ nanospindle p-n heterostructure. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2020; 45(55): 31327-31340.
 12. Ding W., Ansari N., Yang Y., Bachagha K., Superiorly sensitive and selective H₂ sensor based on p-n heterojunction of WO₃-CoO nanohybrids and its sensing mechanism. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2021; 46(56): 28823-28837.
 13. Zhu S., Tian Q., Wu G., Bian W., Sun N., Wang X., Li C., Zhang Y., Dou H., Gong C., Highly sensitive and stable H₂ gas sensor based on p-PdO-n-WO₃-heterostructure-homogeneously-dispersing thin film. *Int. J. Hydrogen Energy. Hydrogen Energy Publications LLC,* 2022; 47: 17821-17834
 14. Mineo G., Moulae K., Neri G., Mirabella S., Bruno E. H₂ detection mechanism in chemoresistive sensor based on low-cost synthesized WO₃ nanorods. *Sensors Actuators B Chem.* 2021; 348: 130704.
 15. Zhao M., Huang J.X., Ong C.W. Sensors and Actuators B : Chemical Diffusion-controlled H₂ sensors composed of Pd-coated highly porous WO₃ nanocluster films. *Sensors Actuators B. Chem.* 2014; 191: 711-718.
 16. Lee Y., Kalanur S.S., Shim G., Park J., Seo H. Sensors and Actuators B : Chemical Highly sensitive gasochromic H₂ sensing by nano-columnar WO₃ -Pd films with surface moisture. *Sensors Actuators B. Chem.* 2017; 238: 111-119.
 17. Zhou R., Lin X., Xue D., Zong F., Zhang J., Duan X., Li Q., Wang T. Sensors and Actuators B : Chemical Enhanced H₂ gas sensing properties by Pd-loaded urchin-like W₁₈O₄₉ hierarchical nanostructures. *Sensors Actuators B. Chem.* 2018; 260: 900-907.
 18. Lee J., Kim S.Y., Yoo H.S., Lee W.



- Pd-WO₃ chemiresistive sensor with reinforced self-assembly for hydrogen detection at room temperature. *Sensors Actuators B Chem.* 2022; 368: 132236.
19. Senguttuvan T.D., Srivastava V., Tawal J.S., Mishra M., Srivastava S., Jain K. Gas sensing properties of nanocrystalline tungsten oxide synthesized by acid precipitation method. *Sensors Actuators, B Chem.* 2010; 150(1): 384-388.
20. Boudiba A., Zhang C., Umek P., Bittencourt C., Snyders R., Olivier M.G., Debliquy M. Sensitive and rapid hydrogen sensors based on Pd-WO₃ thick films with different morphologies. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2013; 38(5): 2565-2577.
21. Horprathum M., Srichaiyaperk T., Samransuksamer B., Wisitsoraat A., Eiamchai, P., Limwichean S., Chananonawathorn C., Aiempanakit K., Nuntawong N., Patthanasettakul V. Ultrasensitive hydrogen sensor based on Pt-decorated WO₃ nanorods prepared by glancing-angle dc magnetron sputtering. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2014; 6(24): 22051-22060.
22. Zhang C., Boudiba A., Navio C., Bittencourt C., Olivier M., Snyders R., Debliquy M. Highly sensitive hydrogen sensors based on co-sputtered platinum-activated tungsten oxide films. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2010; 36(1): 1107-1114.
23. Drmosh Q.A., Hendi A.H., Hossain M.K., Yamani Z.H., Moqbel R.A., Hezam A., UV-activated gold decorated rGO/ZnO heterostructured nanocomposite sensor for efficient room temperature H₂ detection. *Sensors Actuators, B Chem.* 2019; 290: 666-675.
24. Kumar G.S., Xuejin L., Du Y., Geng Y., Hong X. UV-light enhanced high sensitive hydrogen (H₂) sensor based on spherical Au nanoparticles on ZnO nanostructured thin films. *J. Alloys Compd.* 2019; 798: 467-477.
25. Adachi Y. Enhancement of H₂ gas sensing properties of ZnO films by Mg alloying. *Surfaces and Interfaces.* 2022; 28: 101597.
26. Du Y., Gao S., Mao Z., Zhang C., Zhao Q., Zhang S. Sensors and Actuators B: Chemical Aerobic and anaerobic H₂ sensing sensors fabricated by diffusion membranes depositing on Pt-ZnO film. *Sensors Actuators B. Chem.* 2017; 252: 239-250.
27. Kim H., Pak Y., Jeong Y., Kim W., Kim J., Young G. Sensors and Actuators B: Chemical Amorphous Pd-assisted H₂ detection of ZnO nanorod gas sensor with enhanced sensitivity and stability. *Sensors Actuators B. Chem.* 2018; 262: 460-468.
28. Kim J., Mirzaei A., Woo H., Sub S. Sensors and Actuators B: Chemical Pd functionalization on ZnO nanowires for enhanced sensitivity and selectivity to hydrogen gas. *Sensors Actuators B. Chem.* 2019; 297; 126693.
29. Bao Y., Wei P., Xia X., Huang Z., Homewood K., Gao Y. Remarkably enhanced H₂ response and detection range in Nb doped rutile/anatase heterophase junction TiO₂ thin film hydrogen sensors. *Sensors Actuators, B Chem.* 2019; 301: 127143.
30. Kumaresan M., Venkatachalam M., Saroja M., Gowthaman P. TiO₂ nanofibers decorated with monodispersed WO₃ heterostructure sensors for high gas sensing performance towards H₂ gas. *Inorg. Chem. Commun.* 2021; 129: 108663.
31. Kim H., Moon W., Jun, Y., Hong S. High H₂ sensing performance in hydrogen trititanate-derived TiO₂. 2006; 120: 63-68.
32. Xia X., Wu W., Wang Z., Bao Y., Huang Z., Gao Y. Sensors and Actuators B: Chemical A hydrogen sensor based on orientation aligned TiO₂ thin films with low concentration detecting limit and short response time. *Sensors Actuators B. Chem.* 2016; 234: 192-200.
33. Yoo K.S., Park S.H., Kang J.H. Nano-grained thin-film indium tin oxide gas sensors for H₂ detection. *Sensors and Actuators* 2005; 108: 159-164.
34. Steinebach H., Kannan S., Rieth L., Solzbacher F. Sensors and Actuators B: Chemical H₂ gas sensor performance of



- NiO at high temperatures in gas mixtures. *Sensors Actuators B. Chem.* 2010; 151(1): 162-168.
35. Abdul R., Sabirin A., Zhen J., Field M.R., Austin M., *Sensors and Actuators B: Chemical Nanoporous Nb₂O₅ hydrogen gas sensor. Sensors Actuators B. Chem.* 2013; 176; 149-156.
36. Lu S., Zhang Y., Liu J., Li H.Y., Hu Z., Luo X., Gao N., Zhang B., Jiang J., Zhong A. Sensitive H₂ gas sensors based on SnO₂ nanowires. *Sensors Actuators, B Chem.* 2021; 345: 130334.
37. Pradeep N., Venkatraman U., Grace A.N. Flexible hydrogen gas sensor: ZnO decorated SnO₂ nanowire on over head projector (OHP) sheet substrate. *Mater. Today Proc.* 2019; 45: 4073-4080.
38. Zappa D., Kaur N., Moumen A., Comini E. Metal Oxide Nanowire-Based Sensor Array for Hydrogen Detection. *Micromachines.* 2023; 14: 2124.
39. Kim J., Mirzaei A., Woo H., Sub S. *Sensors and Actuators B: Chemical Improving the hydrogen sensing properties of SnO₂ nanowire-based conductometric sensors by Pd-decoration. Sensors Actuators B. Chem.* 2019; 285: 358-367.
40. Shaposhnik A.V., Shaposhnik D.A., Turishchev S.Y., Chuvenkova O.A., Ryabtsev S.V., Vasiliev A.A., Vilanova X., Hernandez-Ramirez F., Morante J.R. Gas sensing properties of individual SnO₂ nanowires and SnO₂ sol-gel nanocomposites. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2019; 10: 1380-1390.
41. Aysha Parveen R., Ajay Rakkesh R., Durgalakshmi D., Balakumar S. Graphene-Ag₂S hybrid nanostructures: A hybrid gas sensor for room temperature hydrogen sensing application. *Mater. Lett.* 2021; 303: 130470.
42. Zhu Z., Liu C., Jiang F., Liu J., Ma X., Liu P., Xu J., Wang L., Huang R. Flexible and lightweight Ti₃C₂T_x MXene@Pd colloidal nanoclusters paper film as novel H₂ sensor. *J. Hazard. Mater.* 2020; 399: 123054.
43. Tabares G., Redondo-Cubero A., Vazquez L., Revenga M., Cortijo-Campos S., Lorenzo E., de Andrés A., Ruiz E., Pau J.L. A route to detect H₂ in ambient conditions using a sensor based on reduced graphene oxide. *Sensors Actuators, A Phys.* 2020; 304: 111884.
44. Wu J., Guo Y., Wang Y., Zhu H., Zhang X. Ti₃C₂ MXene-derived sodium titanate nanoribbons for conductometric hydrogen gas sensors. *Sensors Actuators B Chem.* 2022; 361: 131693.
45. Lee S., Kang Y., Lee J., Kim J., Shin J.W., Sim S., Go D., Jo E., Kye S., Kim J. Atomic layer deposited Pt nanoparticles on functionalized MoS₂ as highly sensitive H₂ sensor. *Appl. Surf. Sci.* 2022; 571: 151256.
46. Rasch F., Postica V., Schütt F., Kumar Y., Shaygan A., Lohe M.R., Feng X., Adelung R., Lupan O. *Sensors and Actuators B: Chemical Highly selective and ultra-low power consumption metal oxide based hydrogen gas sensor employing graphene oxide as molecular sieve. Sensors Actuators B. Chem.* 2020; 320: 128363.
47. Su P., Chuang Y. *Sensors and Actuators B: Chemical Flexible H₂ sensors fabricated by layer-by-layer self-assembly thin film of multi-walled carbon nanotubes and modified in situ with Pd nanoparticles. Sensors Actuators B. Chem.* 2010; 145(1): 521-526.
48. Katsuki A., Fukui K. H₂ selective gas sensor based on SnO₂. *Sensors Actuators, B Chem.* 1998; 52(1-2): 30-37.
49. Weh T., Fleischer M., Meixner H. Optimization of physical filtering for selective high temperature H₂ sensors. *Sensors and Actuators B.* 2000; 68: 146-150.
50. Fleischer, M., Seth, M., Kohl, C., & Meixner, H.P. (1996). A selective H₂ sensor implemented using Ga₂O₃ thin-films which are covered with a gas-filtering SiO₂ layer. *Sensors and Actuators B-chemical*, 1996; 36: 297-302.
51. Meng X., Zhang Q., Zhang S., He Z. The Enhanced H₂ Selectivity of SnO₂ Gas Sensors with the Deposited SiO₂ Filters on Surface of the Sensors. *Sensors.* 2019; 19:



2478.

52. Layer M. Hydrogen Sensing Performance of ZnO Schottky Diodes in Humid Ambient Conditions with PMMA. *Sensors*. 2020; 20: 835

53. Yakovlev P.V., Shaposhnik A.V., Voishchev V.S., Kotov V.V., Ryabtsev S.V.. Determination of gases using polymer-coated semiconductor sensors. *J. Anal. Chem.* 2002; 57(3): 276-279.

54. Huo L., Yang X., Liu Z., Tian X., Qi T., Wang X., Yu K., Sun J., Fan M. Sensors and Actuators B: Chemical Modulation of potential barrier heights in Co₃O₄ / SnO₂ heterojunctions for highly H₂-selective sensors. *Sensors Actuators B. Chem.*, 2017; 244: 694-700.

55. Krivetskiy V., Efitov A., Arkhipenko A., Vladimirova S., Rummyantseva M., Dolenko S., Gaskov A. Selective detection of individual gases and CO/H₂ mixture at low concentrations in air by single semiconductor metal oxide sensors working in dynamic temperature mode. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018; 254:502-513.

56. Shaposhnik A.V., Moskalev P.V., Chegereva K.L., Zviagin A.A., Vasiliev A.A. Selective gas detection of H₂ and CO by a single MOX-sensor. *Sensors Actuators, B Chem.*, 2021; 334(18): 129376.

57. Vasiliev A., Shaposhnik A., Moskalev P., Kul O. SnO₂ – PdO_x and Selective Determination of CO and H₂ in Air. *Sensors*. 2023;. 23: 373058.

58. Fetisov V., Davardoost H., Mogylevets V. Technological Aspects of Methane–Hydrogen Mixture Transportation through Operating Gas Pipelines Considering Industrial and Fire Safety. *Fire*. 2023; 6(10)

59. Shaposhnik A., Moskalev P., Sizask E., Ryabtsev S., Vasiliev A. Selective

detection of hydrogen sulfide and methane by a single MOX-sensor. *Sensors (Switzerland)*. 2019;19(5): 1135.

60. Shaposhnik A. V., Zviagin A. A., Ryabtsev S. V., Dyakonova O. V., Vysotskaya E. A. Synthesis and sensory properties of tungsten (VI) oxide-based nanomaterials. *Kondensirovannyye Sredy I Mezhfaznyye Granitsy = Condensed Matter and Interphases*, 2024; 26(2): 349-355. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2024.26/11946>

61. Krivetskiy V.V., Rummyantseva M.N., Gaskov A.M. Chemical modification of nanocrystalline tin dioxide for selective gas sensors. *Russian Chemical Reviews*. 2013; 82(10): 917-941. <https://doi.org/10.1070/RC2013v082n10ABEH004366>

62. SHaposhnik A.V. Opredelenie optimal'nyh temperaturnykh rezhimov poluprovodnikovyyh sensorov. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2008; 8(3): 501-506. (In Russ.)

63. Shaposhnik A., Moskalev P., Vasiliev A. Selective Detection of Hydrogen and Hydrogen Containing Gases with Metal Oxide Gas Sensor Operating in Non-Stationary Thermal Regime. *Proceedings*. 2019; 14(1):2. <https://doi.org/10.3390/proceedings2019014002>.

64. Hara S., Sakamoto H., Miyayama M., Kudo T. Proton-conducting properties of hydrated tin dioxide as an electrolyte for fuel cells at intermediate temperature. *Solid State Ionics*. 2002; 154: 679-685.

65. Dobrovolsky Y., Leonova L, Nadkhina S., Panina N. Low-temperature proton conductivity in hydrated and nonhydrated tin dioxide. *Solid State Ionics*. 1999; 119(1): 275-279.

Информация об авторах / Information about the authors

А.В. Шапошник – д.х.н., заведующий кафедрой химии Воронежского государственного аграрного университета, Воронеж, Россия

A.V. Shaposhnik – Doctor of Chemistry, Head of Department of Chemistry Voronezh State Agrarian University, Voronezh, Russia, E-mail: a.v.shaposhnik@gmail.com



А.А. Звягин – к.х.н., доцент кафедры химии кафедры химии Воронежского государственного аграрного университета, Воронеж, Россия

О.А. Арефьева – технолог, АО НПО ПРИБОР, Санкт-Петербург, Россия

О.В. Дьяконова – к.х.н., доцент кафедры химии кафедры химии Воронежского государственного аграрного университета, Воронеж, Россия

С.В. Рябцев – д.ф.-м.н., заведующий лабораторией физического факультета Воронежского государственного университета, Воронеж, Россия

А.А. Васильев – д.т.н., зав. лаборатории сенсорных систем, государственный университет «Дубна», Россия

A.A. Zviagin – Candidate of Chemical Sciences. Associate Professor of Department of Chemistry Voronezh State Agrarian University, Voronezh, Russia. E-mail: a.a.zviagin@rambler.ru

O.A. Arefieva – researcher of Joint-Stock-Company Scientific and Production Association "Pribor", Saint Petersburg, Russia

O.V. Dyakonova – Candidate of Chemical Sciences. Associate Professor of Department of Chemistry Voronezh State Agrarian University, Voronezh, Russia. E-mail: dyakol@yandex.ru

S.V. Ryabtsev – Doctor of Physics and mathematics, Head of Laboratory of Physics Faculty of Voronezh State University, Voronezh, Russia. E-mail: ryabtsev@phys.vsu.ru

A.A. Vasiliev – professor, head of sensor laboratory, State University «Dubna», Russia

Статья поступила в редакцию 29.02.2024; одобрена после рецензирования 02.04.2024; принята к публикации 03.04.2024.

The article was submitted 29.02.2024; approved after reviewing 02.04.2024; accepted for publication 03.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544:663.51

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12236

Методы ГЖХ, ДСК и ИК-спектроскопии в изучении коровьего молочного жира

**Игорь Александрович Саранов¹✉, Ярослав Олегович Рудаков^{2,3},
Олег Борисович Рудаков³, Владимир Федорович Селеменев²,
Константин Константинович Полянский³, Анатолий Николаевич Лукин²**

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия,
mr.saranov@mail.ru ✉

²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

³Воронежский государственный технический университет, Воронеж, Россия

Аннотация. Для целей надежной идентификации натурального коровьего молочного жира получены газохроматографические данные с применением ионизационно-пламенного детектора (ГЖХ-ПИД) о жирнокислотном составе молока 4 пород – красно-пестрой, черно-пестрой, голштинской и джерсейской в переходный период от пастбищного к стойловому содержанию, по методике, рекомендованной ГОСТ 32261-2013; получены также газохроматографические данные (ГЖХ-ПИД) о триглицеридном составе по ГОСТ Р 70238-2022. В комплексе с хроматографическими методиками изучены термограммы молочного жира методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), а также проанализированы ИК-спектры образцов молочного жира. При статистическом анализе данных о суммарном влиянии генетических и фенотипических факторов на химический состав жиров и масел, на теплофизические параметры (температуры и тепловые эффекты плавления, полиморфных превращений) выявлены тесные природные корреляции между некоторыми отдельными жирными кислотами, триглицеридами и теплофизическими параметрами ДСК, характерные для конкретных липидов. Нарушение выявленных корреляций может указывать на внесение в продукт жиров-заменителей, фракционирование, переэтерификацию или иное физико-химическое воздействие на образец масложирового сырья. Применение комплекса методик ГЖХ-ПИД, ДСК и ИК-спектроскопии позволяет не только надежно идентифицировать натуральное сырье, но и зачастую его происхождение, т.е. породу скота и условия, в которых произведена сельхозпродукция.

Ключевые слова: коровий молочный жир, газожидкостная хроматография, пламенно-ионизационный детектор, дифференциальная сканирующая калориметрия, инфракрасная спектроскопия

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-73-01166. <https://rscf.ru/project/23-73-01166/>

Для цитирования: Саранов И.А., Рудаков Я.О., Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Полянский К.К., Лукин А.Н. Методы ГЖХ, ДСК и ИК-спектроскопии в изучении коровьего молочного жира // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 335-352. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12236>

Original article

GLC, DSC, and IR spectroscopy methods in the study of bovine milk fat

**Igor A. Saranov¹✉, Yaroslav O. Rudakov^{2,3}, Oleg B. Rudakov³,
Vladimir F. Selemenov², Konstantin K. Polyansky³, Anatoliy N. Lukin²**

¹Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia, mr.saranov@mail.ru ✉

²Voronezh State University, Voronezh, Russia

³Voronezh State Technical University, Voronezh, Russia

Abstract. In order to achieve reliable identification of natural bovine milk fat, we obtained gas chromatography data using a flame ionization detector (GLC-FID) on the fatty acid composition of milk of 4 breeds: Red Pied, Black Pied, Holstein, and Jersey. The milk was obtained during the transition period from pasture to indoor housing using the method recommended by GOST 32261-2013. Gas chromatographic data (GLC-FID) on the triglyceride composition were obtained according to GOST R 70238-2022. In addition to chromatographic techniques, we also studied thermograms of milk fat by differential scanning calorimetry (DSC) and analysed the IR spectra of milk fat samples. The statistical analysis of data on the total influence of genetic and phenotypic factors on the chemical composition of fats and oils, on thermophysical parameters (temperatures and thermal effects of melting, polymorphic transformations) revealed close natural correlations between some individual fatty acids, triglycerides, and DSC thermophysical parameters characteristic of certain lipids. Violation of the revealed correlations may indicate the use of fat substitutes in the product, fractionation, transesterification, or other physicochemical impacts on fat and oil raw materials. Using a set of GLC-FID, DSC, and IR spectroscopy techniques makes it possible not only to reliably identify natural raw materials, but often their origin as well, i.e. the breed of livestock and the production conditions of agricultural products.

Keywords: bovine milk fat, gas-liquid chromatography, flame ionisation detector, differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy.

Acknowledgements. The study was supported by Russian Science Foundation grant No. 23-73-01166. <https://rscf.ru/project/23-73-01166/>

For citation: Saranov I.A., Rudakov Ya.O., Rudakov O.B., Selemenev V.F., Polyansky K.K., Lukin A.N. GLC, DSC, and IR spectroscopy methods in the study of bovine milk fat. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 335-352. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12236>

Введение

Молочный жир – ценный продукт переработки коровьего молока, один из наиболее распространённых в кулинарии животных жиров, основная фаза (дисперсионная среда) в сливочном масле, которое с физико-химической точки зрения является эмульсией типа «вода в масле». Сливочное масло разных сортов содержит 50-82.5% молочного жира (чаще – 72.5-82.5%; в топленом масле – около 99%). Молочный жир состоит преимущественно из триглицеридов, содержащих остатки различных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Основная доля приходится на олеиновую, пальмитиновую, миристиновую и стеариновую кислоты. Имеются полиненасыщенные незаменимые кислоты – линолевая, линоленовая и арахидоновая. Присутствие заметного (7-8 % в сумме) количества низкомолекулярных жирных кислот (масляной, капроновой, каприловой и каприновой) – отличительная особенность химического состава глицеридов молочного жира, другие животные жиры и растительные масла содержат низкомолекулярные кислоты в меньших количествах. Содержание насыщенных жиров в молочном жире может достигать $\approx 70\%$ [1-2].

Разработано и внедрено в пищевую индустрию большое количество заменителей молочного жира (ЗМЖ). Заменители молочного жира производят из немодифицированных или модифицированных растительных масел (пальмоядровое, пальмовое, кокосовое, подсолнечное, соевое и др.), для улучшения потребительских характеристик (например, для придания сливочного вкуса, улучшения реологических свойств) производители применяют различные пищевые добавки: эмульгаторы (лецитин, моно- и диглицериды и другие). Кроме этого, сливочное масло из натурального коровьего молочного жира фальсифицируют добавками в сливочное масло частично гидрогенизированных жиров, полученных из сырья морских промыслов, добавками фракций пальмового масла или говяжьего жира [1-6], ЗМЖ и фальсифицирующие добавки имеют существенно более низкую стоимость, чем молочный жир, поэтому производители молочной и масложировой продукции имеют соблазн частично или полностью заменить в продукции молочный жир и не всегда довести этот факт до потребителей. ГОСТ 32261-2013 «Масло сливочное. Технические условия», ГОСТ 31663-2012 «Масла растительные и жиры



животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот», ГОСТ 33490-2015 «Молоко и молочная продукция. Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием», ГОСТ ISO 17678-2015 «Молоко и молочная продукция. Определение отсутствия примеси в молочном жире с помощью анализа триглицеридов методом газовой хроматографии (контрольный метод)» и ГОСТ Р 70238-2022 «Метод идентификации состава жировой фазы и определение массовой доли молочного жира», распространяются на сливочное масло, изготавливаемое из коровьего молока и/или молочных продуктов и побочных продуктов переработки молока, предназначенные для непосредственного употребления в пищу, кулинарных целей и использования в других отраслях пищевой промышленности. В этих стандартах приведены способы определения состава жирных кислот (ЖК) и фракций триглицеридов (ТГ), характерных для молочного жира, установлены нормативы и на диапазоны природных колебаний химического состава жира. Однако, из-за широких диапазонов варьирования жирно-кислотного состава в натуральном молочном жире и достаточно больших границах относительной погрешности хроматографических измерений, 25-50% замены в сливочном масле молочного жира на ЗМЖ может быть не обнаружено по результатам только одной стандартизированной методики. Дополнительные возможности обнаружения фальсификации молочного жира дает проверка характерных для натурального продукта природных корреляций между отдельными жирными кислотами. Как показано в [7,8], наиболее чувствительны к изменению суммарного состава ЖК три кислоты – каприновая (C10:0), лауриновая (C12:0) и миристиновая (C14:0), между их содержанием в молочном жире наблюдаются и самые тесные линейные

корреляции. ГОСТ 32261-2013 также нормирует соотношения между отдельными жирными кислотами. При наличии фальсифицирующих добавок эти соотношения могут нарушаться.

Если жирно-кислотный состав можно искусственно «подогнать» под натуральный, то триглицеридный состав молочного жира из-за большого количества вариаций триненасыщенных (UUU), мононенасыщенных, диненасыщенных (SUU), динасыщенных, мононенасыщенных (SSU) и тринасыщенных (SSS) триглицеридов фальсификации не подлежит; это совершенно нерентабельно, и, по-видимому, это не осуществимо (обозначение жирнокислотного остатка U от англ. unsaturated, а S – saturated). Не случайно была разработана и аттестована методика газохроматографического определения фракционного состава триглицеридов (ГОСТ Р 70238-2022), хотя, по нашему мнению, метод ВЭЖХ был бы более уместен для контроля над составом триглицеридов молочного и других жиров [9], однако методика с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ к настоящему времени не валидизирована. В ГОСТ ИСО 17678-2015 и ГОСТ Р 70238-2022 выделено 16 фракций триглицеридов ТГ, которые обозначены как C24, C26, C28, C30 и так с шагом 2 до C54 включительно (рис. 1-2), где число равно сумме атомов углерода в трех остатках ЖК в триглицеридах. В нормативных документах не обозначено, какой молочный жир считать стандартным.

Используя ГОСТ 32261-2013 и ГОСТ Р 70238-2022, ни по хроматограммам метиловых эфиров ЖК образца жира, ни по хроматограммам фракций триглицеридов достоверно нельзя обнаружить наличие в нем смеси моно- и диглицеридов – пищевой добавки E471, которая используется в сельском хозяйстве (корма для животных) и в масложировой промышленности в качестве эмульгатора. В основном ее изготавливают из пальмового масла. В высококачественных марках добавка E471 на

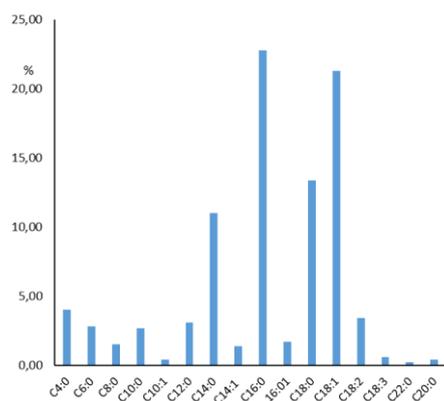


Рис. 1. Диаграмма содержания ЖК в молочном жире коров джерсейской породы

Fig. 1. Diagram of fatty acid content in milk fat from Jersey cows

95% состоит из моностеаратглицерина, в менее дорогих – 95% это смесь моноглицеридов: моностеарата, монопальмитата, монолаурата и мономиристата; 5% диглицеридов: 1,2- и 1,3-дистеарата; 1,2- и 1,3-дипальмитата и др. В некоторых марках E471 моно- и диглицериды содержатся примерно в равных количествах [10]. По числу атомов углерода в остатках ЖК эти смеси должны соответствовать фракциям моноглицеридов C8-C18 и диглицеридов C26-C36, однако свободные одна или две группы -ОН в молекуле глицерида могут за счет «якорного» взаимодействия с неподвижной фазой повлиять на хроматографическое удерживание моно- и диглицеридов, «замаскировав» их на хроматограммах среди фракций ТГ с более высоким числом С.

Цель работы – исследовать образцы натурального молочного жира, подключив к комплексу валидизированных газохроматографических методик определения жирно-кислотного и триглицеридного состава методики ДСК и ИК-спектроскопии.

Термический анализ, в частности метод ДСК, показал, что он не только до-

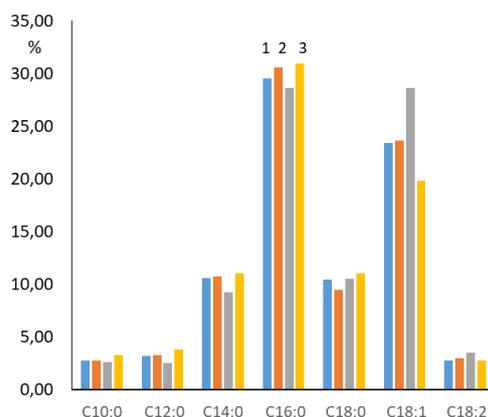


Рис. 2. Содержание 7 основных ЖК в молочном жире коров разных пород:

1 – красно-пестрая порода; 2 – голштинская порода; 3 – черно-пестрая порода; 4 – джерсейская порода

Fig. 2. Content of 7 main fatty acids in milk fat from cows of different breeds: 1 – Red Pied; 2 – Holstein; 3 – Black Pied; 4 – Jersey

полняет хроматографические методы исследования жиров, но может служить альтернативным и самостоятельным методом идентификации масложировой продукции, так как тепловые эффекты, наблюдаемые на термограммах, весьма чувствительны к жирно-кислотному и триглицеридному составу масел и жиров [3,11-16].

ИК-спектроскопия жиров фиксирует инфракрасные колебания различных функциональных групп, позволяет обнаружить, например, *транс*-изомерные двойные связи ЖК [17], наличие фосфолипидов [18,19], а также наличие свободных или ассоциированных групп -ОН, что поможет выявить присутствие моно- и диглицеридов в молочном жире, если это имеет место из-за особенностей кормов или генотипических факторов. По некоторым данным [18-22] в натуральном коровьем молочном жире может находиться от 0.5 до нескольких процентов моно- и диглицеридов. Их концентрации в пахте в три раза выше, чем в безводном молочном жире. В молочных липидах преобладают изомеры 1,2-диацилглицеридов, почти полностью исключая 1,3-изомеры.

Экспериментальная часть

Образцы масел произведены в лабораторных условиях ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Молоко сепарировалось на бытовом сепараторе «Ротор» при температуре 40-45°C, с получением сливок и обраты. Соотношение объема сливок и объема обезжиренного молока (обраты) 1:7.5. Молочный жир получали методом сбивания из сливок, охлажденных в бытовом холодильнике до 3°C и последующим отделением жировой фазы от пахты промыванием ледяной водой. Разделение сливочного масла на жир и плазму проводили по ГОСТ Р 70238-2022 «Молоко и молочная продукция. Метод идентификации состава жировой фазы и определение массовой доли молочного жира». В стакан вместимостью 150 см³ помещали 50-70 г продукта. Стакан с образцом продукта помещали в термостат и выдерживают при температуре (55±5) °C до разделения продукта на жир и молочную плазму. Верхнюю жировую фракцию отделяли, аккуратно перелив ее в другой стакан, и фильтровали через сухой складчатый фильтр при той же температуре.

Для проведения термического анализа использовали прибор синхронного термического анализа STA 449 F3 Jupiter® фирмы NETZSCH. Для анализа брали навески образцов жира в количестве 15-22 мг. Измерения теплофизических свойств проводили в диапазоне температур от -150 до -60°C, скорость нагрева 5 град/мин. Охлаждение системы проводили жидким азотом. Измерения выполняли в атмосфере гелия (расход продувочного газа – 10 см³/мин, расход защитного газа – 10 см³/мин). Точность измерения температуры составляла ±0.3°C. Жирно-кислотный состав образцов молочного жира определяли методом ГЖХ в аккредитованной испытательной лаборатории Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и бла-

гополучия человека Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области» (ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области. Газовый хроматограф Кристалл 2000 М, капиллярная колонка SP-2560 (100 м; 0.25 мм), пламенно-ионизационный детектор. Триглицеридный состав определяли в испытательной лаборатории «Молоко» ВГАНУ «ВНИМИ», газовый хроматограф Кристаллюкс 4000М, капиллярная колонка с неподвижной фазой 65% фенилметилсиликон (30 м; 0.25 мм).

ИК-спектры зарегистрированы в Центре коллективного пользования Воронежского государственного университета на приборе ИК-Фурье-спектрометр исследовательский BRUKER VERTEX 70 с алмазным модулем Platinum ATR однократного нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), угол 45°.

Обсуждение результатов

Был определен состав ЖК в молочном жире коров четырех пород – красно-пестрой, черно-пестрой, голштинской и джерсейской, в переходный период от пастбищного к стойловому содержанию (сентябрь-ноябрь), 18 образцов. Место локации всех коров – Воронежская область, Анненский, Лискинский, Новоусманский, Павловский районы, т.е. в практически одинаковых климатических условиях средней полосы России.

Как известно, красно-пестрая порода коров выведена в России при скрещивании коров симментальской породы с голштинскими быками красно-пестрой масти (для скрещивания использовали генетически ценных быков-производителей из США и Канады). Порода была утверждена в конце 90-х. Красно-пестрые коровы отличаются выраженным молочным типом, схожим с типом голштинского скота. Молоко этих коров используют для производства сливочного масла и твердых сыров. Чёрно-пёстрая порода – порода крупного рогатого скота, прежде

всего, молочного направления продуктивности. Чёрно-пёстрая порода является родственной голландской породе. Выведена в СССР в 1930-1940-е гг. в результате скрещивания местного скота, разводимого в различных зонах страны, с чёрно-пёстрым скотом остфризской, чёрно-пёстрой шведской и других пород, происходящих от голландской породы. Порода утверждена в 1959 г., когда от неё отделили животных с красными окрасами.

Голштинская порода является самой распространённой породой молочного скота в мире. Эта порода коров считается одной из лучших в мире по удойности. Голштинская порода была создана в США и Канаде в результате селекции голландской и чёрно-пёстрой породы коров по продуктивности.

Джерсейская порода относится к мелким породам коров молочного направления. Одна из самых старых и жирномолочных культурных пород. Ещё совсем недавно неизвестная в России джерсейская порода занимает сегодня по численности 2-е место в мире после голштинской породы, причём её популяция стремительно растёт из-за того, что при меньших потребностях в жизненном пространстве, меньшем потреблении корма (более низких затратах на кормление, составляющих 60% себестоимости молока), джерсейская порода показывает конверсию корма на 30% превосходящую голштинскую породу, а её молоко ценится как минимум на 20% выше молока других пород. Джерсейская порода выведена в Англии на острове Джерси путём улучшения местного нормандского и британского скота и отбора его по жирномолочности.

В табл. 1 приведены результаты определения состава ЖК в молочном жире. Для наглядности на диаграмме (рис.1) в качестве примера дано распределение ЖК по молекулярной массе для джерсейской породы.

По отдельным ЖК, как видно из табл. 1, наблюдаются определенные отклонения от норматива. Фальсификация молочного жира исключена, поскольку молоко было отобрано под непосредственным контролем авторов и самими экспериментаторами получена жировая фаза в лабораторных условиях. Отсюда можно было бы сделать вывод, что ГОСТ 32261-2013 даёт несколько зауженный диапазон варьирования ЖК, не вполне учитывающий индивидуальные особенности жирно-кислотного состава коров разных пород, сезон, климатические условия и рацион питания этих коров.

В ГОСТ 32261-2013 допустимый диапазон содержания ЖК уже был расширен для отдельных кислот по сравнению с ГОСТ Р52253-2004. Возможно, норматив следует еще раз пересмотреть. Если взглянуть на цифры в табл. 1, то можно отметить, что в пределах допустимых границ погрешностей определения (для содержания менее 5% $\Delta=\pm 0.4$, а для более 5% $\Delta=\pm 2.2$), большинство показателей соответствуют нормативам, но находятся близко к нижней или верхней границам допустимых диапазонов содержания ЖК. Т.е. для содержания, например, 1.0% допустимы значения 1.0 ± 0.4 (т.е. ± 40 отн.%); а для 10.0 имеем 10.0 ± 2.2 (т.е. ± 22 отн.)

Если содержание той или иной жирной кислоты (ЖК) в триглицеридах натурального жира или масла, не подвергшихся фракционированию, химическим и термическим воздействиям, падает или возрастает в зависимости от породы, питания, сезона и других климатических факторов (для животных жиров), сорта (для растительного сырья) и т.д., содержание другой ЖК может симбатно возрастать или уменьшаться. Соблюдение диапазонов, в рамках которых содержание ЖК может варьировать, сохраняя при этом природные корреляции, обусловленные генотипическими и фенотипическими факторами, является признаком натуральности данного жира. Проверим на нашей выборке соблюдение природных

корреляций, выявленных в [7] на основании статистических данных для 50 образцов коровьего молочного жира (табл. 2).

при прочих равных условиях содержания, климата и питания джерсейской породе характерно сравнительно большее

Таблица 1. Жирно-кислотный состав коровьего молочного жира, %
 Table 1. Fatty acid composition of bovine milk fat, %

Жирная кислота	Норма ГОСТ 32261-2013	1	2	3	4
Масляная C4:0	2.4-4.2	2.32-3.45	2.10-3.50	3.30-3.50	2.98-4.00
Капроновая кислота C6:0	1.5-3.0	1.30-2.51	1.30-2.52	1.30-1.50	1.95-2.80
Каприловая кислота C8:0	1.0-2.0	0.80-1.45	0.70-1.55	0.70-1.00	1.50-1.55
Каприновая кислота C10:0	2.0-3.8	1.80-3.25	1.40-3.80	1.40-2.20	2.70-3.31
Деценвая кислота C10:1	0.2-0.4	0.24-0.52	0.2-0.4	0.2-0.21	0.31-0.40
Лауриновая кислота C12:0	2.0-4.4	2.3-3.96	1.70-4.70	1.7-1.9	3.1-4.35
Миристиновая кислота C14:0	8.0-13.0	9.5-12.08	6.80-13.10	6.8-8.0	10.88-11.19
Миристолеиновая кислота C14:1	0.6-1.5	0.71-2.0	0.70-1.90	0.7-1.10	0.96-1.40
Пальмитиновая C16:0	21.0-33.0	23.9-38.31	22.4-38.2	22.4-24.8	22.8-34.13
Пальмитолеиновая кислота 16:1	1.5-2.4	1.2-2.97	1.90-2.50	2.0-2.2	1.58-1.71
Стеариновая кислота C18:0	8-13.5	4.54-14.74	5.8-13.2	6.9-13.2	9.45-13.4
Олеиновая кислота C18:1	20-32	17.21-31.6	15.5-36.6	20.74-36.6	19.04-21.30
Линолевая кислота C18:2	2.2-5.5	2.0-3.91	2.10-4.0	2.7-4.0	2.43-3.48
Линоленовая кислота C18:3	до 1.5	0.05-1.44	0.3-1.00	0.8-0.9	0.24-0.60
Бегеновая кислота C22:0	до 0.1	0.02-0.30	0-0.30	0-0.1	0-0.2
Арахидиновая кислота C20:0	до 0.3	0-0.3	0.1-0.21	0.2-0.3	0.02-0.4

Примечание: 1 – красно-пестрая порода; 2 – голштинская; 3 – черно-пестрая; 4 – джерсейская порода

Низшие ЖК C6:0, C8:0, C10:0, среднемолекулярные C12:0, C14:0, как правило, изменяют свое содержание симбатно относительно друг друга, но при этом наблюдаются отрицательные корреляции их содержания к содержанию высокомолекулярных кислот – стеариновой и олеиновой (C18:0 и C18:1), такая же закономерность характерна для пальмитиновой кислоты (C16:0), ее количество обратно пропорционально количеству стеариновой и олеиновой кислот.

Можно ли оценить по составу ЖК молочный жир коров разных пород? На рис. 2. представлена диаграмма сопоставления содержания 7 основных ЖК молочного жира 4 пород, из которой заметно, что

количество насыщенных ЖК C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 и заметно меньшее количество ненасыщенных кислот C18:1 и C18:2, в то время как для черно-пестрой породы характерны обратные соотношения. Голштинская и красно-пестрая породы характеризуются промежуточными значениями C16:0, C18:0 и C18:1. Жирным шрифтом в табл. 2 выделены наиболее тесные корреляции.

Рассмотрим триглицеридный состав молочного жира (табл.3). На рис. 3 представлена последовательность удерживания триглицеридов, согласно ГОСТ ISO 17678-2015. Из табл.3 видно, что нормированные диапазоны содержания ТГ несколько уже для отдельных фракций ТГ,

Таблица 2. Корреляции между содержанием в коровьем молочном жире ЖК, n=18
 Table 2. Correlations between fatty acid content in bovine milk fat, n=18

Соотношение ЖК	Корреляция	Коэффициент парной корреляции R
C6:0/C8:0	$y=0.48x+0.26$	0.852
C8:0/C10:0	$y=2.47x-0.23$	0.931
C8:0/C12:0	$y=2.68x-0.05$	0.792
C8:0/C14:0	$y=5.22x+4.12$	0.766
C8:0/C18:1	$y=46.98-18.99x$	-0.839
C10:0/C12:0	$y=1.14x+0.05$	0.895
C10:0/C14:0	$y=2.16x+4.48$	0.843
C10:0/C16:0	$y=5.62x+14.16$	0.755
C10:0/C18:0	$y=45.09-7.65x$	0.898
C10:1/C14:0	$y=17.38x+5.03$	0.762
C10:1/C18:1	$y=41.47-56.06x$	0.739
C12:0/C14:0	$y=1.88x+4.45$	0.932
C12:0/C16:0	$y=5.02x+15.66$	0.858
C12:0/C18:0	$y=16.75-2.02x$	0.727
C12:0/C18:1	$y=44.24-6.34x$	-0.947
C14:0/C16:0	$y=2.28x+5.88$	0.785
C14:0/C18:0	$y=20.51-0.98x$	-0.708
C14:0/C18:1	$y=57.14-3.17x$	-0.955
C16:0/C18:0	$y=23.75-0.46x$	-0.925
C16:0/C18:1	$y=50.21-0.88x$	-0.752

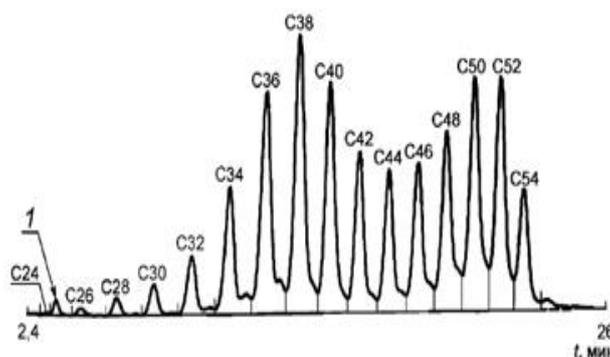


Рис. 3. Порядок удерживания ТГ молочного жира: 1 – холестерин. ГОСТ ISO 17678-2015
 Fig. 3. The retention order of milk fat triglycerides: 1 – cholesterol. GOST ISO 17678-2015

следовательно, их следует расширить хотя бы с учетом погрешностей определения как минимум на $\Delta=\pm 3\%$. На рис. 4 для наглядности представлена диаграмма усредненного содержания ТГ в молочном жире коров джерсейской породы. С некоторыми вариациями, обусловленными содержанием в ТГ жирных кислот, также выглядят графики для двух других пород.

Оценим наличие природных корреляций между отдельными фракциями ТГ

(табл. 4). Как видно из табл. 4, между содержанием ТГ существуют более тесные и более многочисленные корреляции, чем между содержанием жирных кислот. Для отдельных фракций триглицеридов абсолютное значение $R>0.900$. При этом наблюдаются симбатный рост содержания низко- и среднемолекулярных ТГ, например, C30, C32, C34, C38, C42, C44, и асимбатное этому росту понижение концентрации высших ТГ C50, C52 и C54. В качестве примера на рис. 6 и 7 в

качестве примера приведены 2 тесные корреляции.

На рис. 7-8 представлен ИК-спектр типичного образца молочного жира коров

Таблица 3. Триглицеридный состав коровьего молочного жира, %
 Table 3. Triglyceride composition of bovine milk fat, %

Фракция ТГ	Норматив по ГОСТ	1	2	4
C24	0.15-0.39	0.44-0.72	0.49-0.50	0.26-0.46
C26	0.51-1.05	0.99-1.09	0.95-0.96	0.69-1.02
C28	0.76-1.19	1.04-1.10	0.99-1.00	0.61-1.16
C30	1.27-1.78	1.70-1.86	1.64-1.67	1.07-1.96
C32	2.54-3.34	3.12-3.72	3.08-3.21	2.34-3.77
C34	4.01-8.02	6.66-8.22	6.46-6.68	5.77-7.64
C36	9.08-14.01	11.61-13.02	11.08-11.35	11.63-12.09
C38	11.04-15.09	11.54-13.32	11.93-13.30	12.57-13.69
C40	9.02-13.01	8.40-10.3	9.18-11.06	9.85-9.92
C42	6.57-7.57	5.81-8.43	7.05-7.36	6.40-8.10
C44	4.52-7.04	5.18-8.28	6.23-7.74	6.11-7.87
C46	5.01-6.59	5.78-9.23	6.52-8.21	8.67-7.97
C48	6.51-10.40	7.36-10.39	7.72-9.79	7.87-8.77
C50	8.06-12.08	9.30-10.22	9.74-10.82	9.04-11.69
C52	7.08-11.02	4.66-10.72	8.99-7.92	6.15-10.41
C54	2.01-4.07	0.72-5.48	2.21-4.38	1.70-3.77

Примечание: 1 – красно-пестрая порода; 2 – голштинская порода; 4 – джерсейская порода

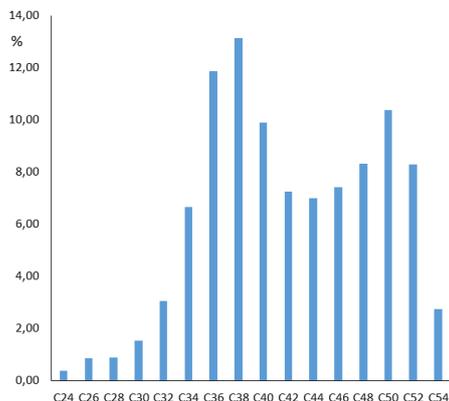


Рис. 4. Содержание фракций ТГ в молочном жире коров джерсейской породы
 Fig. 4. Content of triglyceride fractions in milk fat of Jersey cows

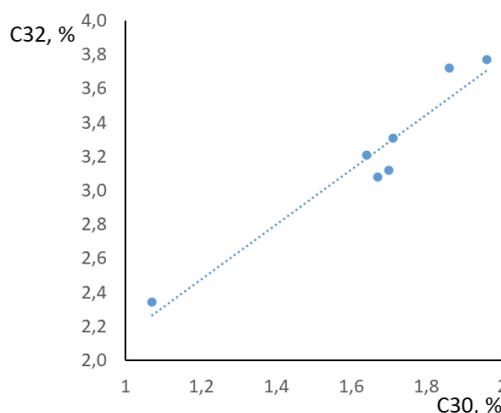


Рис. 5. Корреляция между содержанием в молочном жире ТГ C30 и C32
 Fig. 5. Correlation between the content of C30 and C32 triglycerides in milk fat

На соотношения ТГ влияют и генотипические, и фенотипические факторы, которые можно выявить в дальнейшем при проведении специальных опытов. Очевидно лишь то, что при изменении любого из них состав ТГ не меняется случайным образом, а в соответствии с биохимическими процессами, формирующими этот состав.

(полученного сразу после дойки [8]), а также образца сливочного масла, приобретенного в торговой сети. В табл. 5 дана интерпретация выявленных колебаний функциональных групп [24-28].

Сравнение ИК-спектров образцов молочного жира показывает, что общими полосами поглощения являются максимумы в области 2924-2923 см⁻¹, которые

Таблица 4. Матрица корреляций между содержанием ТГ в натуральном молочном жире, n=7
 Table 4. Correlation matrix between the triglyceride content in natural milk fat, n=7

Соотношение ТГ	Корреляция	Коэффициент парной корреляции R
C24/C26	$y=0.72x+0.60$	0.855
C26/C50	$y=15.33-5.48x$	-0.752
C26/C32	$y=2.87x+0.47$	0.764
C26/C30	$y=1.96x-0.23$	0.880
C 26/C28	$y=1.35x-0.30$	0.958
C28/C30	$y=1.54x+0.12$	0.977
C28/C32	$y=2.40x+0.84$	0.900
C28/C34	$y=3.21x+3.68$	0.731
C28/C50	$y=14.45-4.41x$	-0.853
C30/C50	$y=14.88-2.90x$	-0.888
C30/C34	$y=2.30x+3.07$	0.827
C30/C32	$y=1.62x+0.53$	0.965
C32/C34	$y=1.53x+1.95$	0.925
C32/C50	$y=15.36-1.65x$	-0.849
C32/C52	$y=20.55-3.93x$	-0.820
C34/C52	$y=25.02-2.49x$	-0.859
C34/C38	$y=18.30-0.80x$	-0.795
C34/C36	$y=0.64x+7.45$	0.790
C38/C52	$y=2.16x-19.78$	0.754
C38/C48	$y=25.63-1.33x$	-0.948
C38/C46	$y=25.35-1.24x$	-0.844
C38/C40	$y=0.86x-1.19$	0.827
C40/C46	$y=18.53-1.13x$	0.796
C42/C44	$y=1.20x-1.68$	0.942
C42/C46	$y=0.98x+0.36$	0.786
C42/C52	$y=23.82-2.19x$	0.898
C42/C54	$y=14.80-1.64x$	0.888
C44/C54	$y=12.94-1.44x$	-0.987
C44/C52	$y=20.69-1.82x$	-0.949
C44/C48	$y=0.78x+3.15$	0.834
C44/C46	$y=0.93x+0.97$	0.943
C46/C48	$y=0.91x+1.82$	0.954
C46/C52	$y=21.19-1.77x$	-0.908
C46/C54	$y=13.64-1.44x$	-0.972
C48/C54	$y=14.45-1.34x$	-0.865
C48/C52	$y=22.19-1.55x$	-0.808
C52/C54	$y=0.71x-2.78$	0.937

характерны для валентных асимметричных колебаний ν_{as} CH и CH₂ групп; 2855-2853 см⁻¹, которые характерны для валентных симметричных колебаний ν_s этих групп [23-27]. Наличие данных групп подтверждается также присутствием в ИК-спектрах полос поглощения 1465-1462 см⁻¹ (ножничные колебания σ CH₂ в группах -CH₂-C=O); 1378-1374 см⁻¹ (ножничные колебания σ_s групп -CH₃ в

алифатических цепочках)[23-25]; 1174-1160 см⁻¹ (маятниковые колебания метильных групп γ_t); 1114-1105 см⁻¹ (ножничные колебания σ_s в группах CH, CH₂ и CH₃); 722-713 см⁻¹ (крутильные колебания γ_t CH в группах RCH=CHR'). Наряду с этим, во всех ИК-спектрах образцов молочного жира наличествуют пики 1746-1742 см⁻¹ (валентные колебания C=O в группах -C-O-C(R)=O); 1239-1235 см⁻¹

(валентные асимметричные колебания ν_{as} –C-O-C– в сложных эфирах) [23-25] (см. табл. 5).

пестрой, джерсейской и голштинской пород содержат преимущественно триацил-L-глицериды:

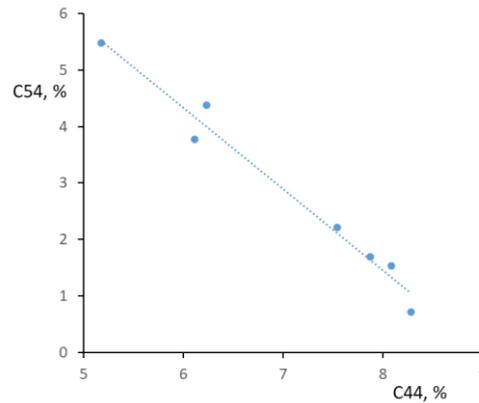


Рис. 6. Корреляция между содержанием в молочном жире ТГ C44 и C54
 Fig. 6. Correlation between the content of C44 and C54 triglycerides in milk fat

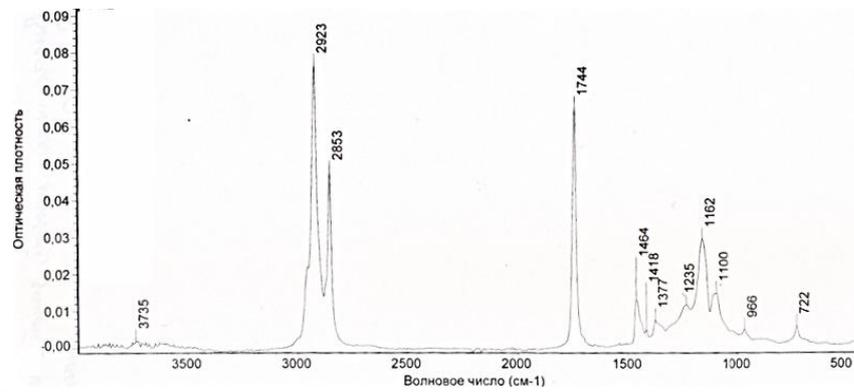


Рис.7. ИК-спектр молочного жира коровы красно-пестрой породы, луговой выпас, частное хозяйство. с. Ямное Воронежской области
 Fig.7. IR spectrum of milk fat from a Red Pied cow, pasture grazing, private farm. Yamnoye village in the Voronezh Region.

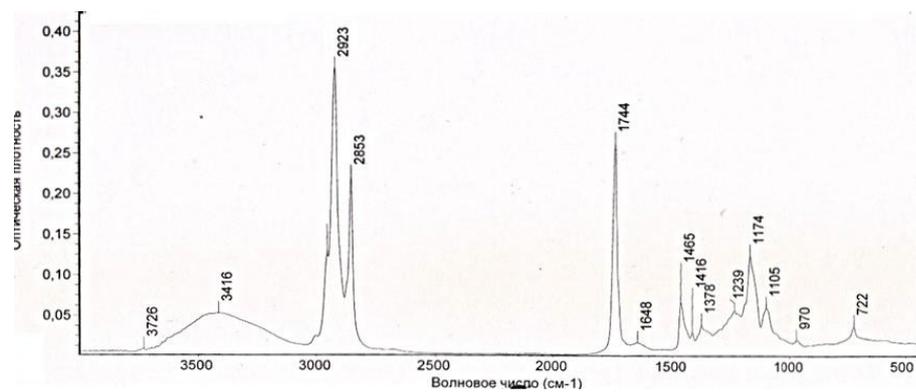


Рис. 8. ИК-спектр сливочного масла, произведенного из молока коров голштинский породы
 Fig. 8. IR spectrum of butter produced from the milk of Holstein cows

Многочисленные факты свидетельствуют в пользу того, что образцы молочного жира коров черно-пестрой, красно-

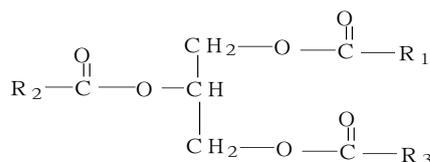


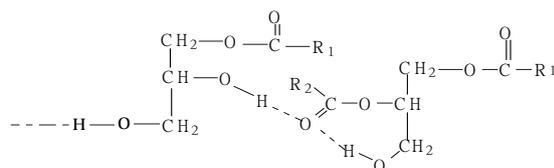
Таблица 5. Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах образцов молочного жира. см⁻¹
 Table 5. Assignment of the absorption bands in the IR spectra of milk fat samples, cm⁻¹

Черно-пестрая, красно-пестрая, джерсейская породы	Голштинская	Сливочное масло из молочного жира голштинской породы	Отнесение полос поглощения, колебания функциональных групп
-	3739*	3726*	ν OH в спиртах, свободные
-	3408	3416	ν OH...O в спиртах ассоциированных
2924	2923	2923	ν CH и CH ₂ асимметричные
2854	2855	2853	ν CH и CH ₂ симметричные
1746	1742	1744	ν C=O в группах C-O-C(R)=O
-	1645	1648*	ν C=C в RCH=CHR' (транс)
-	1549	-	ν C=O в β -кетозэфирах
1465 1418	1462 1416	1465 1416	Ножничные CH ₂ ; σ CH ₂ В -CH ₂ -CO-
1378	1374	1378	σ_s CH ₃ в алифатических цепях
1239	1235	1238	ν_{as} в -C-O-C- в сложных эфирах
1165	1160	1174	Маятниковые γ_t метильной группы
1114	1108	1105	Ножничные CH в CH ₂ и CH ₃
966	-	970	Веерные γ_w CH в RCH=CHR'
722	713	722	Крутильные γ_t CH в RCH=CHR'
-	647	-	

*слабые колебания

где R_i – остатки жирных кислот. Однако в ИК-спектрах молочного жира коров голштинской породы имеются полосы поглощения 3739-3726 см⁻¹ (валентные колебания ν неассоциированных групп – OH); 3416-4308 см⁻¹ (валентные колебания ν OH...O в спиртовых группах); 1549 см⁻¹ (валентные колебания в β -кетозэфирах) [24-28]. Указанные максимумы отсутствуют в ИК-спектрах образцов молочного жира коров других пород.

Очевидно, в молочном жире коров голштинской породы наряду с триацил-Г-глицеридами присутствуют 1,2-диацилглицериды и/или 1-ацилглицериды, способные образовывать водородные связи:



Заслуживает внимания максимум в ИК-спектре коров голштинской породы при 1645 см⁻¹ (валентные колебания ν C=C в RCH=CHR') и 673 см⁻¹ (крутильные γ_t колебания CH в RCH=CHR'), которые обусловлены наличием остова ненасыщенной жирной кислоты, преимущественно располагающейся у второй гидроксильной группы глицерина. Сливочное масло, приобретенное в торговой сети, имеет размытую широкую полосу с максимумом при 3416 см⁻¹ и слабую по-

лосу при 1648 см^{-1} . Полоса 3416 см^{-1} отвечает колебаниям группам $-\text{OH}$, связанных водородными связями в ассоциатах, а полоса 1648 см^{-1} характерна для двойной связи в *транс*-изомерах. Вероятней всего в этом образце полоса 3416 см^{-1} обусловлена наличием в сливочном масле смеси моно- и диглицеридов, используемых в качестве кормовой или пищевой добавки E471, как эмульгатор-стабилизатор. При проверке ИК-спектра молочного жира коров голштинской породы, полученного непосредственно после дойки на предприятии той же фирмы, выпускающей сливочное масло, опять же найдена полоса группы $-\text{OH}$, отсутствующая в молочном жире других пород. Это может означать, что в кормах коров скорее всего содержалась добавка E471. Специалисты считают, что эта добавка повышает удои коров. Пищевая добавка E471 имеет международный статус GRAS, который позволяет использовать ее без ограничений. В качестве эмульгатора E471 улучшает реологические свойства сливочного масла [20-22]. Следует отметить, что в ИК-спектрах, например, пальмового масла имеются полосы поглощения 1221 см^{-1} и 1099 см^{-1} , которые отсутствуют в ИК-спектрах коровьего жира и отвечают за валентные колебания метильных групп в третичнометильных группировках и валентные колебания в ацеталах, фрагменты которых могут присутствовать в жирно-кислотных цепочках пальмового масла [24]. Характерными только для растительных масел являются полосы в области $3009\text{-}3006\text{ см}^{-1}$ ($\nu\text{ CH}$ в $\text{RCH}=\text{CHR}'$), не выраженные для молочного жира. Является ли наличие заметных количеств моно- и диглицеридов особенностью жира голштинских коров, или это результат приема кормов с пищевой добавкой E471? Содержание моно- и диглицеридов в молоке может быть результатом липолиза молочной жира из-за неправильного обращения с молоком и его хранения. Однако было ранее пока-

зано, что диглицериды естественным образом содержится в свежесдоенном молоке, что позволяет предположить, что некоторые из диглицеридов, содержащихся в молоке, являются промежуточными звеньями в биосинтезе ТГ, а не продуктами распада [20], даже незначительные количества таких липидов, содержащихся в молочном жире, даже в тех низких концентрациях, которые обычно встречаются в природе, могут существенно влиять на кристаллизацию и плавление молочного жира.

Остановимся на теплофизических свойствах исследуемых образцов молочного жира. Коль жирно-кислотный и триглицеридный состав молочного жира вариативен, зависит от генотипических и фенотипических факторов, а профиль термограмм ДСК чувствителен к химическому составу молочного жира, представилось интересным найти различия в теплофизических свойствах молочного жира в зависимости от породы коров. Полиморфное поведение молочного жира, конечно, усложняет интерпретацию термограмм, полученных для молочного жира. Кривые ДСК образцов представлены на рис. 9. В табл. 6 приведены количественные параметры термограмм.

На рис. 9 отмечены характеризующие процесс плавления, такие параметры как температура первого пика - t_1 ; температура впадины - t_1' , температура второго пика - t_2 , температура третьего пика - t_3 и площадь под кривой S , которая характеризует общую теплоемкость жира.

Отношение температур t_2/t_3 наиболее чувствительно реагирует на замену молочного жира посторонними жировыми продуктами и в целом на соотношение ТГ [29]. Все кривые ДСК имеют три типичных эндотермических пика, характерного для молочного жира [30]. Данные пики имеют сложный геометрический профиль, поскольку они образованы в результате фазовых (полиморфных) переходов различных групп ТГ. Первый эндотермический пик образован группой ТГ с

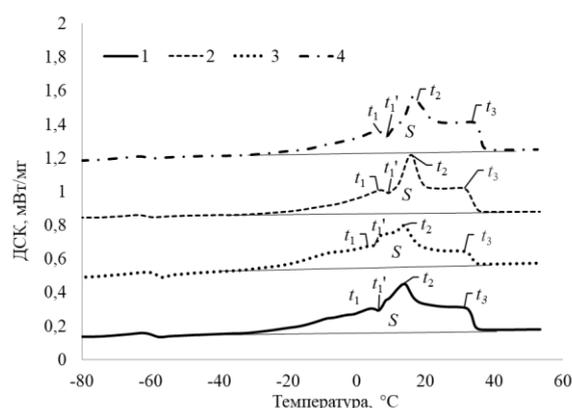


Рис. 9. Кривые ДСК образцов молочного жир различных пород коров: 1 – красно-пёстрой; 2 – голштинской. 3 – черно-пестрая, 4 – джерсейской
 Fig. 9. DSC curves of milk fat samples from different breeds of cows: 1 – Red Pied; 2 – Holstein; 3 – Black Pied; 4 – Jersey

Таблица 6. Параметры плавления образцов молочного жира
 Table 6. Melting parameters of milk fat samples

№	t_2 , °C	t_3 , °C	t_2/t_1	S , Дж/г
1	12.3	16.7	1.36	88.7
2	10.1	16.2	1.60	94.4
3	9.6	16.4	1.71	93.2
4	8.6	18.0	2.09	93.2

*1 – красно-пестрая порода; 2 – голштинская порода; 4 – джерсейская порода.

низкой температурой плавления (Low melting point, LMP). Второй эндотермический пик образован более многочисленной группой ТГ со средней температурой плавления (Medium melting point, MMP). Третий эндотермический пик образован группой ТГ с высокой температурой плавления (High melting point, HMP). Границей между LMP и MMP служит впадина при t_1' , граница между MMP и HMP размыта и может быть определена только приблизительно [30]. Группы ТГ – LMP, MMP и HMP, не только плавятся раздельно, но и ведут себя как твердые растворы. Эндотерма LMP соответствует плавлению ТГ с высоким содержанием длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот и насыщенных жирных кислот с короткой цепью, UUS, таких как ВОО, ВРО и РРО (В – масляная кислота C4:0; О – олеиновая кислота C18:1; Р – пальмитиновая кислота C16:0). Фракция LMP является жидкой при комнатной температуре. Основные триглицериды, плавящиеся во фракции MMP, содержат

одну короткую насыщенную цепь или одну ненасыщенную USS и SSS, такие как ВРР и РРО. Фракция HMP богата ЖК с длинными насыщенными цепями, такие как РРР. Интересно отметить, что было обнаружено, что триглицерид РРО плавится под тремя эндотермами. Плавление триглицеридов фракции MMP наиболее важно для сенсорных свойств молочного жира во рту [30].

Таким образом, у всех образцов молочного жира наблюдаются группы пиков LMP, MMP и HMP, однако у образца молочного жира голштинской породы впадина при t_1' практически не наблюдается так как пики при t_1 и t_2 расположены ближе друг к другу, чем в других образцах. Это различие обусловлено скорее всего породой и рационом питания животного.

На кривых ДСК образцов 1 и 2 у самого основания второго эндотермического пика явно проявляется плечо (подпик), которое на кривой красно-пестрой

Таблица 7. Тренды значений t_3 от содержания отдельных фракций ТГ
 Table 7. Trends in t_3 values depending on the content of individual triglyceride fractions

Содержание фракции ТГ (x)	t_3
C54	$y=11.6x-13.8$
C52	$y=1.7x+3.4$
C50	$y=2.8x-11.1$
C48	$y=50-3.9x$
C46	$y=76.8-7.9x$
C44	$y=84-9.5x$
C42	$y=144.2-17.4x$
C40	$y=4.9x-30.4$
C38	$y=3.8x-32.1$
C36	$y=75-4.8x$
C34	$y=38.5-3.1x$
C32	$y=34.6-5.5x$
C30	$y=29.2-7.7x$
C28	$y=26.4-9.6x$
C26	$y=26.5-10.1x$
C24	$y=20.4-7.2x$

жирным шрифтом выделены асимбатные тренды

коровы имеет гораздо более яркий характер. При этом у образцов джерсейской и черно-пестрой коровы данный пик существенно сглаживается в небольшой перегиб. Третий пик ДСК на всех кривых имеет разный характер, так в образцах 1 и 2 при переходе от второго пика до самого окончания плавления наблюдается плавные спуски, в случае третьего образца – имеется плато, а в случае 4-го образца имеется даже максимум пика 3. Однако температура максимума 3 пика имеет четкие тренды в зависимости от содержания всех фракций ТГ (табл. 7).

Обращает на себе внимание, что с увеличением концентрации C50-C54 и C38-C40 температура t_3 растет, а с увеличением содержания C42-C48 и увеличением содержания C24-C36 падает (степень детерминации $R^2 \approx 0.94$), таким образом, этот пик можно отнести к суперпозиции ТГ с длинными насыщенными цепями USS и SSS, такими как PPP, PPO, а также ТГ содержащими кроме C16:0 еще C18:0 или C20:0. Другие параметры термограмм не показали тесных трендов. Таким образом, джерсейская порода наиболее сильно отличается от других пониженным значением t_2 и максимальным

значением t_3 , что согласуется с составом ЖК и ТГ. В работе [22] также отмечается, что молочный жир джерсейской породы имеет более высокое содержание летучих ЖК, чем, например, голштинской.

Заключение

Подтверждено наличие тесных природных корреляций между некоторыми отдельными жирными кислотами, впервые выявлены еще более тесные природные корреляции между содержанием в молочном жире фракций триглицеридов, обнаружены тренды между количеством триглицеридов и отдельными теплофизическими параметрами, измеренными методом ДСК. Найденные корреляции и тренды могут служить критериями натуральности молочного жира и отнесения образца молочного жира к определенной породе коров. Нарушение выявленных корреляций может указывать на внесение в продукт жиров-заменителей, фракционирование, переэтерификацию или иное физико-химическое воздействие на образец масложирового сырья. Методом

ИК-спектроскопии обнаружено присутствие в молочном жире моно- и диацилглицеридов. Применение комплекса методик ГЖХ-ПИД, ДСК и ИК-спектроскопии позволяет не только надежно идентифицировать натуральное сырье, но и зачастую его происхождение, т.е. породу скота и условия, в которых произведена сельхозпродукция.

Список литературы/References

1. Rudakov O.B., Korol'kova N.V., Polyanskij K.K., Rudakova L.V., Kotik O.A. *Texnoximicheskij kontrol` v tehnologii zhirov i zhirozamenitelej*. SPb, Lan`. 2024. 576 p. (In Russ.)
2. Rudakov O.B., Lesnikova E.P., Polyanskij K.K., Semenova I.N. *Tovarnyj menedzhment. e`kspertiza i ocenka kachestva zhirov`x tovarov*. SPb: Lan`. 2020. 304 p. (In Russ.)
3. Polyanskij K.K., Snegirev S.A., Rudakov O.B. *Differencial`ny`j termicheskij analiz pishhevy`x zhirov*. M., DeliPrint. 2004. 86 p. (In Russ.)
4. Rudakov O.B., Ponomarev A.N., Polyanskij K.K., Lyubar` A.V. *Zhiry`. Ximicheskij sostav i e`kspertiza kachestva*. M., Deli Print. 2005. 312 p. (In Russ.)
5. Rudakov O.B., Rudakova L.V., Parinov D.B., Snegirev S.A., Polyanskij K.K. *E`kspertnaya sistema po optimizacii receptury` spredov. Masla i zhiry`*. 2009; 3: 20-24. (In Russ.)
6. Rudakov O.B., Polyanskij K.K., Rudakova L.V. *Kontrol`ny`e karty` v pomoshh` e`kspertu. Pererabotka moloka*. 2016; 5(199): 28-31. (In Russ.)
7. Rudakov O.B., Selemenev V.F., Plotnikova O.V., Sezin I.M., Dubinina T.V. *Statisticheskij podxod v opredelenii natural`nosti zhirov po xromatograficheskim dannym*. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2002; 2(3): 295-303. (In Russ.)
8. Rudakov O.B., Saranov I.A., Polyanskij K.K. *Zhirno-kislotny`j sostav molochного zhira korov razny`x porod. Pere-rabotka moloka*. 2024; 5: 66-69. (In Russ.)

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. An` V.N., Dejneka V.I., Xien Ch.T.N., Dejneka L.A., Rudakov O.B. *Ustanovlenie podlinnosti sy`rov metodom obrashhenno-fazovoj VE`ZhX. Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2018; 18(6): 816-824. (In Russ.)
10. Zykov A.V., Krysanov V.A., Mokshina N.Ya. *Gazoxromatograficheskoe opredelenie kolichestvennogo sostava pishhevy`x e`mul`gatorov E471. Analitika i kontrol*. 2015; 19(2): 169-174. (In Russ.)
11. Rudakov O.B., Saranov I.A., An` Nguen Van An`, Rudakova L.V., Polyanskij K.K. *Differencial`naya skaniruyushhaya kalorimetriya kak metod kontrolya podlinnosti rastitel`ny`x masel. Zhurn. analit. khimii*. 2021; 76(2): 183-192. (In Russ.)
12. Ramazanov A.Sh., Balaeva Sh.A., Rudakov O.B., Saranov I.A. *Vliyanie klimaticheskix uslovij Respubliki Dagestan na sodержание zhirного masla i drugix biologicheskix aktivny`x veshhestv v plodax rastoropshi pyatnistoj. Khimiya rastitelnogo syrya*. 2021; 4: 207-215. (In Russ.)
13. Rudakov O.B., Saranov I. A., Balaeva Sh.A., Ramazanov A. Sh., Rudakov Ya.O. *Differencial`naya skaniruyushhaya kalorimetriya kak metod kontrolya podlinnosti masla dikorastushhej rastoropshi pyatnistoj. Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2021; 76(12): 1137-1145. (In Russ.)
14. Rudakov O.B., Saranov I.A., Polyanskij K.K. *Termicheskij analiz v kontrole kachestva slivochnого masla. Molochnaya promyshlennost`*. 2018; 11: 38-40. (In Russ.)
15. Rudakov O.B., Polyanskij K.K., Griбанov A.Yu., Dejneka V.I. *Mozhno li s pomoshh`yu DTA obnaruzhit` minorny`e dobavki zamenitelej molochного zhira v*



slivochnom masle? *Syrodellie i maslodellie*. 2015; 5: 50-53. (In Russ.)

16. Rudakov O.B., Saranov I.A., Polyan-skij K.K. Vy`yavlenie pal`movogo masla v fal`sifirovannom slivochnom masle metodom DSK. *Syrodellie i maslodellie*. 2019; 3: 51-53. (In Russ.)

17. Rudakov O.B., Rudakova L.V. Trans-izomerny`e zhirny`e kisloty`: vzglyad ximika-analitika. *Pererabotka moloka*. 2019; 3: 37-39. (In Russ.)

18. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A. Fosfolipidy` na fone prirodny`x matricz. Voronezh: IPCz Nauchnaya kniga, 2020, 318 p. (In Russ.)

19. Fagan R., Wijesundera Ch., Watkins P. Determination of mono- and di-acylglycerols in milk lipids. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1054(1-2): 251-259. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.052>

20. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B. Lipidomika. Voronezh, Nauchnaya kniga. 2023, 316 p. (In Russ.)

21. Pishhevye dobavki: enciklopediya. L.A. Sarafanova (sost.). SPb., Professiya, 2012. 776 p. (In Russ.)

22. Richard D.O`Brajen. Zhiry i masla. Proizvodstvo, sostav i svoystva, primeneniye / per. s angl. 2-go izd. V.D. Shirokov. D.A. Babekina. N.S. Selivanova. N.V. Magda. SPb.: Professiya. 2007. 752 p. (In Russ.)

23. Kazicina L.A., Kupletskaya N.B. Primeneniye UF-, IK- i YaMR-spektroskopii v organicheskoy khimii. M., Vy`sshaya shkola. 1971. 264 s. (In Russ.)

24. Pimentell D., Mak-Klellan O. Vodnorodnaya svyaz`. M., Mir. 1964. 462 p. (In Russ.)

25. Nakanisi K. Infrakrasnaya spektroskopiya i stroeniye organicheskix soedinenij. M., Mir. 1965. 216 p. (In Russ.)

26. Karpov S.I., Selemenev V.F. Infrakrasnaya spektroskopiya sorbentov. Voronezh: Nauchnaya kniga. 2024. 376 p. (In Russ.)

27. Dexant I., Dancz R., Kimmer V., Shmol`ke R. Infrakrasnaya spektroskopiya polimerov. M., Ximiya. 1976. 472 p. (In Russ.)

28. Rudakov O.B., Saranov I.A., Polyan-skij K.K. Kontrol` sodержaniya pal`movogo masla v smesyax s molochny`m zhirom metodom DSK. *Analitika i kontrol`*. 2019; 23(1): 127-135. <https://doi.org/10.15826/analitika.2019.23.1.010> (In Russ.)

29. Ten Grotenhuis E. et al. Polymorphism of milk fat studied by differential scanning calorimetry and real-time X-ray powder diffraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999; 76(9): 1031-1039.

30. Lopez C. Crystallization properties of milk fats. *Crystallization of lipids: Fundamentals and applications in food, cosmetics, and pharmaceuticals*. 2018, 283-321.

Информация об авторах / Information about the authors

И.А. Саранов – к.т.н., доцент кафедры информационной безопасности Воронежского государственного университета инженерных технологий, Воронеж, Россия

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

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

I.A. Saranov – Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Department of Information Security of the Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia, mr.saranov@mail.ru

Ya.O. Rudakov – Postgraduate student of the Department of Analytical Chemistry of Voronezh State University, Engineer of the Department of Chemistry and Chemical Technology of Materials of the Voronezh State Technical University, Voronezh, Russia

O.B. Rudakov – Doctor of Chemical Sciences, Head of Department of Chemistry and Chemical Technology of Materials of Voronezh State Technical University, Voronezh, Russia



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

К.К. Полянский – д.т.н., профессор кафедры химии и химической технологии материалов Воронежского государственного технического университета, Воронеж, Россия

А.Н. Лукин – к.ф.-м.н., старший научный сотрудник Центра коллективного пользования Воронежского государственного университета, Россия

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

K.K. Polyansky – Doctor of Technical Sciences, Professor of the Department of Chemistry and Chemical Technology of Materials of Voronezh State Technical University, Voronezh, Russia

A.N. Lukin – Candidate of Physical Sciences, Senior Researcher the Center for Collective Use of Voronezh State University, Russia

Статья поступила в редакцию 1.06.2024; одобрена после рецензирования 10.07.2024; принята к публикации 17.07.2024.

The article was submitted 01.06.2023; approved after reviewing 10.07.2024; accepted for publication 17.07.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723.23

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12237

Молекулярно-динамическое моделирование адсорбции оптических изомеров лейцина на хиральной супрамолекулярной поверхности γ -глицина

Регина Халимовна Шаяхметова[✉], Владимир Юрьевич Гуськов

Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия, shayakhmetovarih@gmail.com[✉]

Аннотация. Для установления механизма хирального распознавания поверхностью с супрамолекулярной хиральностью проведено молекулярно-динамическое моделирование адсорбции энантиомеров лейцина на фрагменте кристалла γ -глицина. Симуляции проведены с помощью программного пакета GROMACS с использованием силового поля GROMOS96 54a7. Моделирование сорбции D-, L-лейцина проводили в NVT-ансамбле с модифицированным термостатом Берендсена (V-rescale), предварительно системы подвергали процедуре минимизации энергии и NVT, NPT уравниванию в течение 200 пс при 300 К. Для равномерного распределения молекул адсорбата на поверхности монослоя кристалла глицина применили протокол отжига при 433 К с плавным охлаждением до 230 К. Для того чтобы молекулы глицина не меняли геометрию в процессе симуляции их «заморозили» до 0 К, время симуляции 20 нс. Для исключения взаимодействий молекул адсорбата с обратной стороной слоя кристалла, использованы периодические граничные условия только в направлениях x и y. Проведено моделирование 20, 40, 60, 80 молекул энантиомеров лейцина на фрагменте кристалла γ -глицина размером 147 молекул и поверхности графена 12x6 нм. Рассчитаны Кулоновские энергии и энергии Леннарда-Джонса межмолекулярных взаимодействий глицин-лейцин, лейцин-лейцин, графен-лейцин. При адсорбции 20 молекул лейцина на поверхности γ -глицина с направленными вверх COO⁻ группами степень заполнения поверхности глицина $\theta \approx 0.44$. При такой степени заполнения между энантиомерами лейцина не наблюдается заметных различий по Кулоновской энергии и энергии Леннарда-Джонса взаимодействий глицин-лейцин. Однако при адсорбции 40 молекул лейцина ($\theta \approx 0.88$) Кулоновская энергия взаимодействий энантиомеров лейцина с поверхностью глицина различается на 168.0 кДж/моль, а энергия Леннарда-Джонса на 15.1 кДж/моль. При адсорбции 60 молекул лейцина ($\theta \approx 1.32$) наблюдается значительное отличие в энергии Кулона ($\Delta E_{\text{Coul}}\text{Gly-Leu} = 664.1$ кДж/моль) и Леннарда-Джонса ($\Delta E_{\text{LJ}}\text{Gly-Leu} = 194.5$ кДж/моль) взаимодействий глицин-лейцин. При адсорбции 80 молекул лейцина ($\theta \approx 1.76$) отличие в энергиях взаимодействий лейцин-глицин ($\Delta E_{\text{Coul}}\text{Gly-Leu} = 116.7$ кДж/моль, $\Delta E_{\text{LJ}}\text{Gly-Leu} = 105.4$ кДж/моль). При адсорбции лейцина ($\theta \approx 0.44$) на поверхности γ -глицина с направленными вверх NH₃⁺ группами, наблюдается значительная разница в энергиях взаимодействиях глицин-лейцин уже при адсорбции 20 молекул ($\theta \approx 0.44$, $\Delta E_{\text{Coul}}\text{Gly-Leu} = 420.0$ кДж/моль). При адсорбции 40 молекул лейцина ($\theta \approx 0.88$) $\Delta E_{\text{Coul}}\text{Gly-Leu} = 624.4$ кДж/моль, $\Delta E_{\text{LJ}}\text{Gly-Leu} = 71.5$ кДж/моль. При адсорбции 60 молекул лейцина ($\theta \approx 1.32$) $\Delta E_{\text{Coul}}\text{Gly-Leu} = 304.4$ кДж/моль, $\Delta E_{\text{LJ}}\text{Gly-Leu} = 59.1$ кДж/моль. При адсорбции 80 молекул лейцина ($\theta \approx 1.76$) отличие в энергиях взаимодействий глицин-лейцин $\Delta E_{\text{Coul}}\text{Gly-Leu} = 384.8$ кДж/моль, $\Delta E_{\text{LJ}}\text{Gly-Leu} = 122.2$ кДж/моль.

Таким образом, по результатам молекулярно-динамического моделирования установлено, что выбранная форма кристалла γ -глицина проявляет энантиселективность аналогично изученному ранее цитозину. При моделировании адсорбции на разных гранях γ -глицина наблюдается хиральная селективность по отношению к L-лейцину. Обнаружено, что грани с различными функциональными группами проявляют энантиселективность в различном диапазоне степеней заполнения поверхности. Данное явление позволит в будущем добиваться большей энантиселективности поверхности γ -глицина за счёт блокирования грани с карбоксильными группами.

Ключевые слова: молекулярная динамика, GROMACS, адсорбция, аминокислота, супрамолекулярная хиральность, глицин, лейцин, графен.

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



Для цитирования: Шаяхметова Р.Х., Гуськов В.Ю. Молекулярно-динамическое моделирование адсорбции оптических изомеров лейцина на хиральной супрамолекулярной поверхности γ -глицина // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24, № 3. С. 353-363.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12237>

Original article

Molecular-dynamic modelling of the adsorption of optical isomers of leucine on the chiral supramolecular surface of γ -glycine

Regina Kh. Shayakhmetova[✉], Vladimir Yu. Guskov

Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia, shayakhmetovarh@gmail.com[✉]

Abstract. To establish the mechanism for the chiral recognition of a surface with supramolecular chirality, we conducted molecular-dynamic simulation of the adsorption of leucine enantiomers on a fragment of a γ -glycine crystal. Simulations were conducted using the GROMACS software package with the GROMOS96 54a7 force field. Simulation of D- and L-leucine sorption was performed in an NVT ensemble with a modified Berendsen thermostat (V-rescale). Before that, the systems were subjected to energy minimisation and NVT and NPT equilibration for 200 ps at 300 K. To uniformly distribute adsorbate molecules on the surface of a glycine crystal monolayer, we used an annealing protocol at 433 K with gradual cooling to 230 K. To prevent glycine molecules from changing their geometry during the simulation, they were “frozen” to 0 K, and the simulation time was 20 ns. To exclude interactions of adsorbate molecules with the reverse side of the crystal layer, we used periodic boundary conditions only in the x and y directions. Simulations of 20, 40, 60, and 80 molecules of leucine enantiomers were performed on a fragment of a γ -glycine crystal with a size of 147 molecules and a graphene surface of 12x6 nm. The Coulomb and Lennard-Jones energies of intermolecular interactions of glycine-leucine, leucine-leucine, and graphene-leucine were calculated. When 20 leucine molecules were adsorbed on the surface of γ -glycine with upward-directed COO⁻ groups, the degree of covering the glycine surface was $\theta \approx 0.44$. At this degree of covering, there were no distinctive differences in the Coulomb and Lennard-Jones energies of glycine-leucine interactions between the enantiomers of leucine. However, with the adsorption of 40 leucine molecules ($\theta \approx 0.88$), the Coulomb energy of interactions of leucine enantiomers with the glycine surface differed by 168.0 kJ/mol and the Lennard-Jones energy differed by 15.1 kJ/mol. Over the course of adsorption of 60 leucine molecules ($\theta \approx 1.32$), a significant difference was observed in the Coulomb energy ($\Delta E_{\text{Coul}} \text{Gly-Leu} = 664.1$ kJ/mol) and the Lennard-Jones energy ($\Delta E_{\text{LJ}} \text{Gly-Leu} = 194.5$ kJ/mol) of glycine-leucine interactions. Over the course of adsorption of 80 leucine molecules ($\theta \approx 1.76$), there was a difference in glycine-leucine interactions ($\Delta E_{\text{Coul}} \text{Gly-Leu} = 116.7$ kJ/mol, $\Delta E_{\text{LJ}} \text{Gly-Leu} = 105.4$ kJ/mol). Over the course of adsorption of leucine ($\theta \approx 0.44$) on the surface of γ -glycine with upward-directed NH₃⁺ groups, a significant difference was observed in the energies of glycine-leucine interactions already with the adsorption of 20 molecules ($\theta \approx 0.44$, $\Delta E_{\text{Coul}} \text{Gly-Leu} = 420.0$ kJ/mol). Over the course of adsorption of 40 leucine molecules ($\theta \approx 0.88$) $\Delta E_{\text{Coul}} \text{Gly-Leu} = 624.4$ kJ/mol, $\Delta E_{\text{LJ}} \text{Gly-Leu} = 71.5$ kJ/mol. Over the course of adsorption of 60 leucine molecules ($\theta \approx 1.32$) $\Delta E_{\text{Coul}} \text{Gly-Leu} = 304.4$ kJ/mol, $\Delta E_{\text{LJ}} \text{Gly-Leu} = 59.1$ kJ/mol. Over the course of adsorption of 80 leucine molecules ($\theta \approx 1.76$) there was a difference in glycine-leucine interactions $\Delta E_{\text{Coul}} \text{Gly-Leu} = 384.8$ kJ/mol., $\Delta E_{\text{LJ}} \text{Gly-Leu} = 122.2$ kJ/mol.

Thus, based on the results of molecular-dynamic modelling, it was established that the selected form of the γ -glycine crystal demonstrated enantioselectivity similar to the previously studied cytosine. When modelling adsorption on different sides of γ -glycine, we observed chiral selectivity in relation to L-leucine. It was found that the sides with different functional groups showed enantioselectivity in different ranges of surface covering. This phenomenon will allow achieving greater enantioselectivity of the γ -glycine surface in the future by blocking the side with carboxyl groups.

Keywords: molecular dynamics, GROMACS, adsorption, amino acid, supramolecular chirality, glycine, leucine, graphene.

Acknowledgments: the work was carried out with financial support from the Russian Science Foundation, project No. 19-73-10079.

For citation: Shayakhmetova R. h., Guskov V. Yu. Molecular-dynamic modelling of the adsorption of optical isomers of leucine on the chiral supramolecular surface of γ -glycine. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2024. 24(3): 353-363.* (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12237>



Введение

Хиральность является неотъемлемым признаком всего живого [1]. Биополимеры обречены на то, чтобы быть хиральными, в ином случае уровень достигаемой ими иерархии не позволил бы достичь условий создания живой клетки [2]. Будучи геометрическим свойством объекта не совмещаться в n -мерном пространстве со своим зеркальным отражением путём любых движений в таком пространстве [3], хиральность может наблюдаться не только на молекулярном, но и на любом уровне материи [4]. Когда Луи Пастер открыл явление хиральности [5], он увидел асимметрию не молекулы, а кристалла – объекта более высокого уровня иерархии, нежели одна молекула винной кислоты. В случае Луи Пастера, хиральность кристалла была следствием хиральности молекулы мономера. Однако существует ряд случаев, когда исходное соединение не имеет центра, оси или плоскости хиральности, однако результат самосборки молекул – двумерная супрамолекулярная структура или трёхмерный кристалл – хиральны [6-8]. Поэтому для более глубокого понимания причин асимметрии всего живого необходимо изучать, как именно взаимосвязаны молекулярная и иные виды хиральности, и как можно осуществить хиральный трансфер между объектами с различным уровнем иерархии.

На данный момент известно, что системы с супрамолекулярной хиральностью могут индуцировать молекулярную, выступая в качестве исходного вещества для органического синтеза [9-10], катализатора [11-12] или адсорбента [13-15]. Так, ещё в 1969 году Пензейном и Шмидтом было установлено, что хиральный кристалл 4,4'-диметилхалкона, реагируя с бромом, образует не рацемическую смесь, а хиральный дибромид с энантиомерным избытком 6-25% [16]. На сегодняшний день существует более 200 примеров органических синтезов, в которых

использование энантиоморфного кристалла ахирального исходного вещества приводит к частичному, и в редких случаях даже полному смещению хирального равновесия в сторону образования того или иного энантиомера [10]. Также, группой К. Соаи обнаружено, что хиральные кристаллы способны направлять реакцию пиримидин-5-карбальдегида с диизопрропилцинком [17] в сторону образования одного энантиомера [18]. Нашей научной группой обнаружено, что различные системы с супрамолекулярной хиральностью, такие как двумерные супрамолекулярные структуры [19-20] и энантиоморфные кристаллы [21-22], способны селективно адсорбировать преимущественно только один энантиомер, как из газовой фазы, так и из раствора. В этой связи интересно понять механизм, по которому происходит индуцирование хиральности. Для этого полезно осуществить моделирование адсорбции энантиомеров на поверхности с супрамолекулярной хиральностью.

В настоящей работе в качестве объекта исследования выбрана система «энантиомер лейцина – поверхность кристалла γ -глицина». Последний представляет собой энантиоморфный кристалл с пространственной группой симметрии $P3_1$ или $P3_2$ для право- и левовращающих кристаллов соответственно [23]. Поскольку и кристалл, и адсорбат являются аминокислотами, изучение их взаимодействий может пролить свет на причины гомохиральности биополимеров.

Экспериментальная часть

Симуляции проведены с помощью программного пакета GROMACS [24-26] с использованием силового поля GROMOS96 54a7 [27]. Топологии для всех структур генерировали с помощью сервиса ATB [28-29]. Параметры силового поля рассчитаны в приближении теории функционала плотности B3LYP/6-31G*. В качестве поверхности

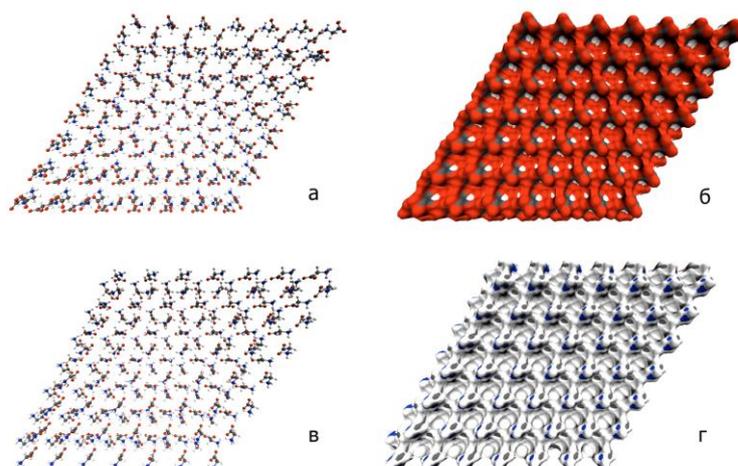


Рис. 1. Структурные формулы слоев глицина и их молекулярные поверхности: а – слой кристалла γ -глицина с полярной поверхностью, вверх направлены COO^- группы; б – молекулярная поверхность слоя кристалла γ -глицина с направленными вверх COO^- группами; в - слой кристалла γ -глицина с неполярной поверхностью, вверх направлены NH_3^+ группы; г - молекулярная поверхность слоя кристалла γ -глицина с направленными вверх NH_3^+ группами. Где красным цветом обозначены атомы кислорода, синим – атомы азота, серым – атомы углерода, белым – атомы водорода.

Fig. 1. Structural formulas of glycine layers and their molecular surfaces: a – layer of γ -glycine crystal with a polar surface, COO^- groups directed upward; b – molecular surface of a γ -glycine crystal layer with COO^- groups directed upward; c – layer of γ -glycine crystal with a non-polar surface, NH_3^+ groups directed upward; d – molecular surface of γ -glycine crystal layer with NH_3^+ groups directed upward. Oxygen atoms are shown in red, nitrogen atoms in blue, carbon atoms in grey, and hydrogen atoms in white.

использовали слой кристалла глицина состоящий из 147 молекул. Глицин в форме γ - кристалла существует в виде цвиттер-иона [30]. Кристалл глицина построен в программе Avogadro [31] из cif-файла, скачанного из Кембриджской кристаллографической базы данных [30, 32]. Была построена суперячейка в программе Avogadro и вырезаны лишние слои. Далее получен слой молекул глицина (рис 1а, рис 1в). Изменение имен атомов в файле координат согласно индексам в силовом поле GROMOS провели в программе VEGA ZZ. Полученную структуру поместили в триклинный бокс с периодическими граничными условиями, длины векторов бокса 5.4 нм 5.4 нм 8 нм, углы векторов бокса $90^\circ 90^\circ 120^\circ$. Степень заполнения поверхности адсорбента молекулами адсорбата рассчитывали как отношение площадей поверхности без учета растворителя рассчитанные в MGLtool/PMV [33]. Расчеты проведены

на компьютере с 16 ядерным процессором AMD Ryzen 9 3950X с частотой 3.50 GHz, оперативной памятью 32,0 ГБ, видеоускорителем NVIDIA GeForce RTX 2070 (8 ГБ).

Моделирование сорбции D-, L-лейцина проводили в NVT-ансамбле с модифицированным термостатом Берендсена (V-rescale), предварительно системы подвергали процедуре минимизации энергии и NVT, NPT уравниванию в течение 200 пс при 300 К. Для равномерного распределения молекул адсорбата на поверхности монослоя кристалла глицина применили протокол отжига при 433 К с плавным охлаждением до 230 К. Для того чтобы молекулы глицина не меняли геометрию в процессе симуляции их «заморозили» до 0 К, время симуляции 20 нс. Для исключения взаимодействий молекул адсорбата с обратной стороной слоя кристалла использованы периодические

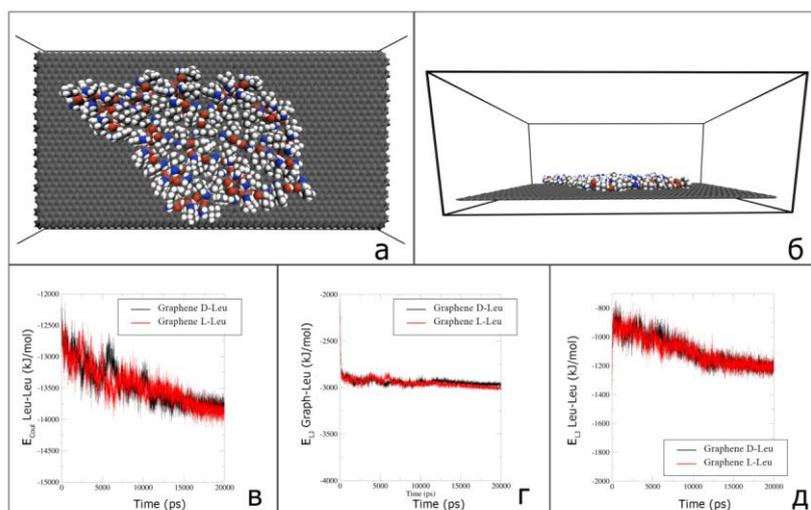


Рис. 2. Адсорбция 60 молекул лейцина на поверхности графена, вид сверху (а) и вид сбоку (б). Изменение энергии Кулона межмолекулярных взаимодействий лейцин-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности графена (в). Изменение энергии Леннарда-Джонса межмолекулярных взаимодействий графен-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности графена (г). Изменение энергии Леннарда-Джонса межмолекулярных взаимодействий лейцин-лейцин при адсорбции D- и L-лейцина на поверхности графена (д).

Fig. 2. Adsorption of 60 leucine molecules on a graphene surface, top view (a) and side view (b). Change in the Coulomb energy of intermolecular leucine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the graphene surface (c). Change in the Lennard-Jones energy of intermolecular graphene-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the graphene surface (d). Change in the Lennard-Jones energy of intermolecular leucine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the graphene surface (e).

граничные условия только в направлениях x и y . Симуляцию адсорбции оптических изомеров лейцина проводили на поверхности глицина, состоящей из 147 молекул, показанной на рис 1а, рис 1в, полученные данные сравнивали с данными, полученными при симуляции адсорбции D-, L-лейцина на поверхности графена размером 12х6 нм.

Обсуждение результатов

Для установления механизма хирального распознавания поверхностью с супрамолекулярной хиральностью была построена модель поверхности кристалла глицина, проведено молекулярно-динамическое моделирование адсорбции энантиомеров лейцина на слое кристалла глицина и поверхности графена размером 12х6 нм.

В качестве объекта сравнения изучалась адсорбция энантиомеров лейцина на графене. На рис. 2 в качестве примера показана адсорбция 60 молекул лейцина на графене (здесь и далее адсорбция каждого энантиомера моделировалась отдельно от другого энантиомера). Как видно из полученных данных, изменение Кулоновской энергии (рис. 2в) и энергии Леннарда-Джонса (LJ) (рис. 2в, рис. 2г) взаимодействия энантиомеров с поверхностью графена, а также взаимодействия между собой в результате адсорбции D-лейцина не отличается от L-лейцина. Графен ожидаемо показал себя как ахиральная поверхность.

В качестве модели слоя кристалла γ -глицина использовали фрагмент супрамолекулярной структуры состоящий из 147 молекул (рис 1), полученный из кристалла из Кембриджской кристаллографической базы данных. Интересно, что

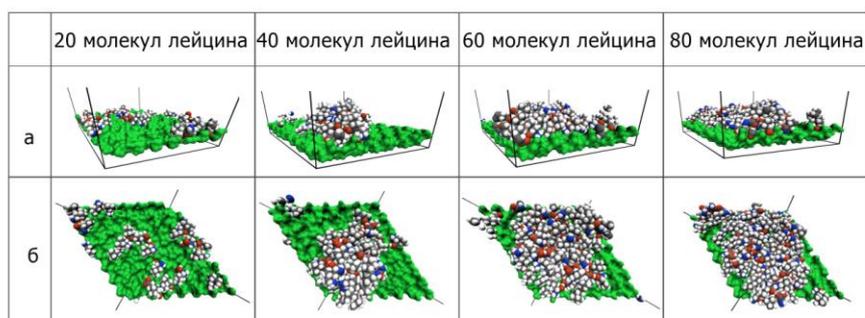


Рис. 3. Вид на моделируемый бокс сбоку, поверхность кристалла γ -глицина с направленными вверх COO^- группами и различное количество адсорбированных молекул D- и L-лейцина (а). Вид сверху, поверхность кристалла γ -глицина с направленными вверх COO^- группами и различное количество адсорбированных молекул D- и L-лейцина (б).
 Fig. 3. Side view of the simulated box, the surface of γ -glycine crystal with upward-facing COO^- groups and different amounts of adsorbed D- and L-leucine molecules (a). Top view, surface of a γ -glycine crystal with COO^- groups directed upward and different amounts of adsorbed D- and L-leucine molecules (b).

верхняя и нижняя поверхность полученного слоя имеет разную полярность. Первая сторона, показанная на рисунках 1а и 1б, обладает нескомпенсированным избытком электронной плотности, за счет направленных вверх COO^- групп. Вторая сторона характеризуется направленными вверх NH_3^+ группами (рис 1в, рис 1г). Известно, что γ -глицин образует супрамолекулярные хиральные слои [34-35]. На рисунках 1б и 1г видно топологию поверхности глицина, при инверсии хиральности всего слоя, возможно получить зеркальный супрамолекулярный ансамбль. В настоящей работе проведено моделирование различного количества молекул лейцина на полярной и неполярной поверхности глицина.

Результаты моделирования адсорбции различного количества молекул лейцина показаны на рисунках 3-5. На рисунке 3 показана визуализация финальной геометрии при моделировании адсорбции различного количества молекул D-лейцина на поверхности глицина с направленными вверх COO^- группами. На рисунке 4 показаны изменения межмолекулярных энергий при адсорбции D- и L-лейцина на поверхности γ -глицина с направленными вверх COO^- группами. При адсорбции 20 молекул лейцина степень заполнения поверхности глицина

$\theta \approx 0.44$. При такой степени заполнения между энантиомерами лейцина не наблюдается заметных различий по Кулоновской энергии и энергии Леннарда-Джонса взаимодействий глицин-лейцин. Анализ распределения молекул по боксу (рис. 3) показывает, что при такой степени заполнения молекулы лейцина могут взаимодействовать друг с другом на поверхности. Такие латеральные взаимодействия возникают, когда молекулы адсорбируются настолько близко друг к другу, что могут взаимодействовать за счёт ван-дер-Ваальсовых сил или образовывать Н-связи. При этом фиксируется различие в латеральных взаимодействиях, отличие энергий Кулона ($\Delta E_{\text{Coul}} \text{Leu-Leu} = 112.1$ кДж/моль) и Леннарда-Джонса ($\Delta E_{\text{LJ}} \text{Leu-Leu} = 55.5$ кДж/моль) взаимодействий лейцин-лейцин. Таким образом, адсорбция энантиомеров лейцина на глицине не отличается, и поверхность не проявляет способность к хиральному распознаванию. Однако при адсорбции 40 молекул лейцина ($\theta \approx 0.88$) Кулоновская энергия взаимодействий энантиомеров лейцина с поверхностью глицина различается на 168.0 кДж/моль, а энергия Леннарда-Джонса на 15.1 кДж/моль. Поверхность

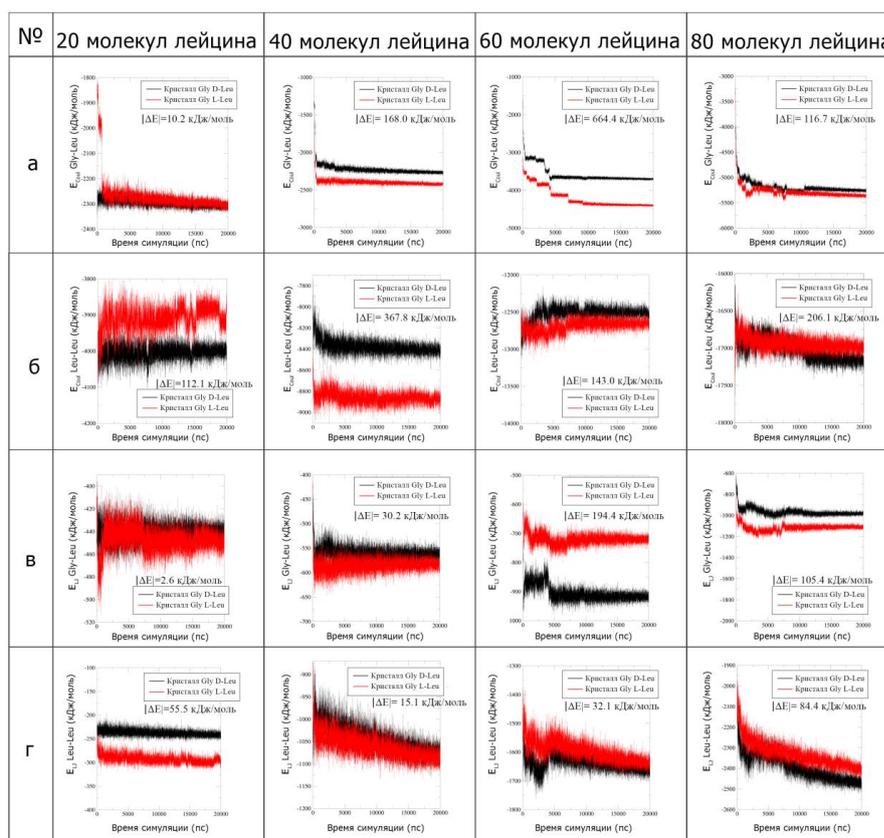


Рис. 4. Изменение энергии Кулона межмолекулярных взаимодействий глицин-лейцин при адсорбции D- и L-лейцина на поверхности γ -глицина с направленными вверх COO^- группами (а). Изменение энергии Кулона межмолекулярных взаимодействий лейцин-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности γ - глицина (б). Изменение энергии Леннарда-Джонса межмолекулярных взаимодействий глицин-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности γ - глицина (в). Изменение энергии Леннарда-Джонса межмолекулярных взаимодействий лейцин-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности γ - глицина (г). Где $|\Delta E|$ модуль разности энергий изображенных на графике в момент времени 20000 пс.

Fig. 4. Change in the Coulomb energy of intermolecular glycine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the surface of γ -glycine with COO^- groups directed upward (a). Change in the Coulomb energy of intermolecular leucine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the surface of γ -glycine (b). Change in the Lennard-Jones energy of intermolecular glycine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the surface of γ -glycine (c). Change in the Lennard-Jones energy of intermolecular leucine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the surface of γ -glycine (d). Where $|\Delta E|$ is the modulus of the energy difference shown on the graph at 20000 ps.

проявляет способность к хиральному распознаванию. При адсорбции 60 молекул лейцина ($\theta \approx 1.32$) наблюдается значительное отличие в энергии Кулона ($\Delta E_{\text{Coul}}(\text{Gly-Leu}) = 664.1 \text{ кДж/моль}$) и Леннарда-Джонса ($\Delta E_{\text{LJ}}(\text{Gly-Leu}) = 194.5 \text{ кДж/моль}$) взаимодействий глицин-лейцин. Поверхность проявляет способность к хиральному распознаванию. При адсорбции 80 молекул лейцина ($\theta \approx 1.76$) от-

личие в энергиях взаимодействий лейцин-глицин ($\Delta E_{\text{Coul}}(\text{Gly-Leu}) = 116.7 \text{ кДж/моль}$, $\Delta E_{\text{LJ}}(\text{Gly-Leu}) = 105.4 \text{ кДж/моль}$) значительно ниже, чем при адсорбции 60 молекул. Во всех описанных выше случаях поверхность γ -глицина с COO^- группами проявляет наибольшую селективность по отношению к L-лейцину. Наблюдаемые результаты аналогичны таковым, наблюдавшимся при моделировании адсорбции энантиомеров лимонена

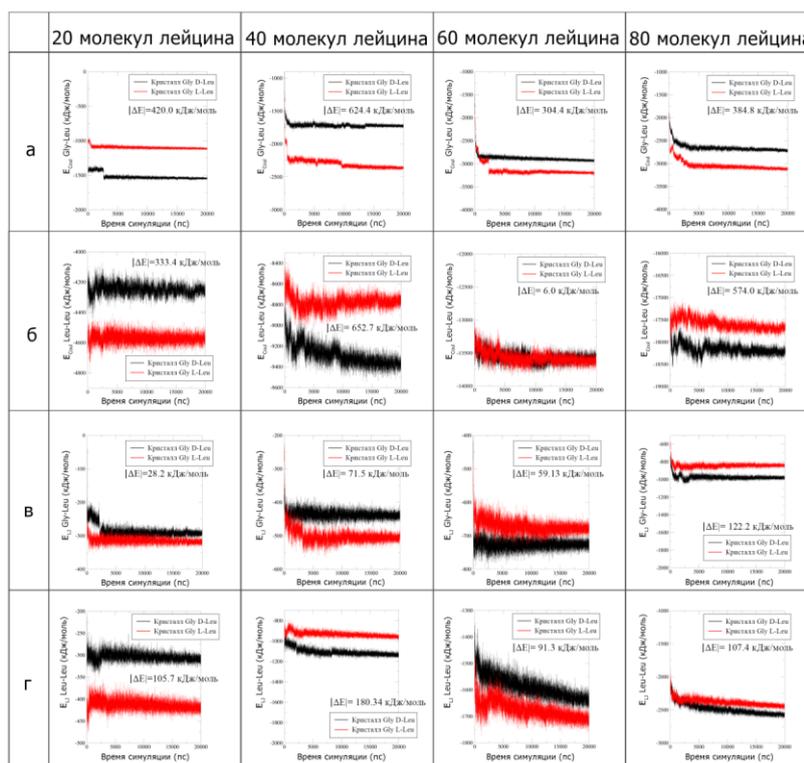


Рис. 5. Изменение энергии Кулона межмолекулярных взаимодействий глицин-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности γ – глицина с направленными вверх NH_3^+ группами (а). Изменение энергии Кулона межмолекулярных взаимодействий лейцин-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности γ – глицина (б). Изменение энергии Леннарда-Джонса межмолекулярных взаимодействий глицин-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности γ – глицина (в). Изменение энергии Леннарда-Джонса межмолекулярных взаимодействий лейцин-лейцин при адсорбции D- и L- лейцина на поверхности γ – глицина (г). Где $|\Delta E|$ модуль разности энергий изображенных на графике в момент времени 20000 пс.

Fig. 5. Change in the Coulomb energy of intermolecular glycine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the surface of γ -glycine with NH_3^+ groups directed upward (a). Change in the Coulomb energy of intermolecular leucine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the surface of γ -glycine (b). Change in the Lennard-Jones energy of intermolecular glycine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the surface of γ -glycine (c). Change in the Lennard-Jones energy of intermolecular leucine-leucine interactions during the adsorption of D- and L-leucine on the surface of γ -glycine (d). Where $|\Delta E|$ is the modulus of the energy difference shown on the graph at 20000 ps.

на супрамолекулярно хиральной поверхности кристаллов цитозина [22]. Наличие хирального распознавания лишь вблизи от монослоя обусловлено способностью поверхности с элементом асимметрии надмолекулярного уровня иерархии распознавать только хиральный объект только такого же размера. В качестве последнего выступает адсорбционный слой лейцина.

На рисунке 5 показаны изменения межмолекулярных энергий при адсорбции D- и L-лейцина на поверхности γ -

глицина с направленными вверх NH_3^+ группами. При адсорбции лейцина ($\theta \approx 0.44$) на такой поверхности γ -глицина, наблюдается значительная разница в энергиях взаимодействиях глицин-лейцин уже при адсорбции 20 молекул ($\theta \approx 0.44$, $\Delta E_{\text{Coul Gly-Leu}} = 420.0$ кДж/моль), в отличие от данных полученных на поверхности γ -глицина с COO -группами. Впервые поверхность глицина проявляет наибольшую селективность по отношению к D-лейцину. При адсорбции 40 молекул лейцина ($\theta \approx 0.88$) $\Delta E_{\text{Coul Gly-}}$



Leu=624.4 кДж/моль, $\Delta E_{L\text{Gly-Leu}}=71.5$ кДж/моль. При адсорбции 60 молекул лейцина ($\theta \approx 1.32$) $\Delta E_{\text{CoulGly-Leu}}=304.4$ кДж/моль, $\Delta E_{L\text{Gly-Leu}}=59.1$ кДж/моль. При адсорбции 80 молекул лейцина ($\theta \approx 1.76$) отличие в энергиях взаимодействий глицин-лейцин $\Delta E_{\text{CoulGly-Leu}}=384.8$ кДж/моль, $\Delta E_{L\text{Gly-Leu}}=122.2$ кДж/моль. Таким образом, в системах с 40, 60 и 80 молекулами лейцина поверхность γ -глицина с NH_3^+ группами проявляет хиральную селективность по отношению к L-лейцину.

Заключение

По результатам молекулярно-динамического моделирования установлено, что выбранная форма кристалла γ -глицина проявляет энантиселективность аналогично изученному ранее цитозину. При

Список литературы/References

1. Davankov V.A., Biological Homochirality on the Earth, or in the Universe? A Selective Review, *Symmetry*, 2018; 10: 749-761. <https://doi.org/doi:10.3390/sym10120749>
2. Percec, V., Leowanawat, P., Why are biological systems homochiral, *Isr. J. Chem.*, 2011; 51 (1107-1117): 1107. <https://doi.org/10.1002/ijch.201100152>
3. Coquerel G., Chiral Discrimination in the Solid State: Applications to Resolution and Deracemization. In *Advances in Organic Crystal Chemistry: Comprehensive Reviews 2015*, Tamura, R.; Miyata, M., Eds. Springer Japan: Tokyo, 2015; 393-420.
4. Liu M., Zhang L., Wang T., Supramolecular chirality in self-assembled systems, *Chem. Rev.*, 2015; 115 (15): 7304-7397. <https://doi.org/10.1021/cr500671p>
5. Pasteur L., Recherches sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique et le sens de la polarisation rotatoire, *Ann. Chim. Phys.*, 1848; 24: 442-459.
6. Viedma C., Coquerel G., Cintas P., Crystallization of Chiral Molecules. In

моделировании адсорбции на разных гранях γ -глицина наблюдается хиральная селективность по отношению к L-лейцину. Обнаружено, что грани с различными функциональными группами проявляют энантиоселективность в различном диапазоне степеней заполнения поверхности. Данное явление позволит в будущем добиваться большей энантиоселективности поверхности γ -глицина за счёт блокирования грани с карбоксильными группами.

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.

Handbook of Crystal Growth, Elsevier: 2015; 952-1002.

7. Sogutoglu L.-C., Steendam R. R. E., Meekes H., Vlieg E., Rutjes F.P.J.T., Viedma ripening: a reliable crystallisation method to reach single chirality, *Chem. Soc. Rev.*, 2015; 44: 6723-6732. <https://doi.org/10.1039/c5cs00196j>

8. Zhang H.-M., Xie Z.-X., Long L.-S., Zhong H.-P., Zhao W., Mao B.-W., Xu X., Zheng L.-S., One-step preparation of large-scale self-assembled monolayers of cyanuric acid and melamine supramolecular species on Au(111) surfaces, *Journal of Physical Chemistry C*, 2008; 112: 4209-4218. <https://doi.org/10.1021/jp076916a>

9. Sakamoto M., Spontaneous chiral crystallization of achiral materials and absolute asymmetric photochemical transformation using the chiral crystalline environment, *J. Photochem. Photobiol., C*, 2006; 7: 183-196. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2006.11.002>

10. Sakamoto M., Mino T., Yoshida Y., Asymmetric synthesis using crystal chirality, *Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi/Journal of Synthetic Organic Chemistry*, 2017; 75 (5): 509-521.



<https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.75.509>

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

12. Soai K., Osanai S., Kadowaki K., Yonekubo S., Shibata T., Sato I., d- and l-quartz-promoted highly enantioselective synthesis of a chiral organic compound, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999; 121: 11235-11236. <https://doi.org/10.1021/ja993128t>

13. Belonogov E.V., Muslimov I.N., Zinoviev I.M., Guskov V.Yu., Kinetic features of the adsorption of menthol enantiomers on o-toluylic acid and CsCuCl₃ crystals with supramolecular chirality, *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2023; 23 (4): 657-666. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11574>

14. Gus'kov V.Yu., Allayarova D.A., Garipova G.Z., Pavlova I.N., Supramolecular chiral surface of nickel sulfate hexahydrate crystals and its ability to chirally recognize enantiomers by adsorption data, *New J. Chem.*, 2020; 44: 17769-17779.

15. Gus'kov V.Y., Gallyamova G.A., Sairanova N.I., 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, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2022; 24: 26785-26794.

16. Penzien K., Schmidt G.M.J., Reactions in chiral crystals: an absolute asymmetric synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1969; 8(8): 608-609. <https://doi.org/10.1002/anie.196906082>

17. Soai K., Shibata T., Morioka H., Choji K., Asymmetric autocatalysis and amplification of enantiomeric excess of a chiral molecule, *Nature*, 1995; 378: 767-768. <https://doi.org/10.1038/378767a0>

18. Soai K., Asymmetric autocatalysis. Chiral symmetry breaking and the origins of homochirality of organic molecules, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 2019; 95(3): 89-110. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.009>

19. Gus'kov V.Y., Sidelnikov A.V., Sukhareva D.A., Gainullina Y.Y., Kudasheva F.K., Maistrenko V.N., Separation of the menthol enantiomers on the sorbent based on supramolecular network structure, *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2016; 16(6): 797-802.

20. Gus'kov V.Y., Sukhareva D.A., Gainullina Y.Y., Hamitov E.M., Galkin Y.G., Maistrenko V.N., Chiral recognition capabilities of melamine and cyanuric acid supramolecular structures, *Supramol. Chem.*, 2018; 30(11): 940-948 <https://doi.org/10.1080/10610278.2018.1489541>

21. Muslimov I.N., Gus'kov V.Yu., Osobennosti supramolekuljarnogo hiral'nogo raspoznavanija pri adsorbicii na poverhnosti kristallov orto-toluilovoj kisloty, *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2023; 23 (2): 189-198. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11143>

22. Gus'kov V.Y., Shayakhmetova R.K., Allayarova D.A., Gilfanova E.L., Pavlova I.N., Garipova G.Z., Mechanism of chiral recognition by enantiomorphous cytosine crystals during enantiomer adsorption, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2021; 23: 11968-11979.

23. Ishikawa K., Tanaka M., Suzuki T., Sekine A., Kawasaki T., Soai K., Shiro M., Lahave M., Asahi T., Absolute chirality of the c-polymorph of glycine: correlation of the absolute structure with the optical rotation, *Chem. Commun.*, 2012; 48: 603-6033. <https://doi.org/10.1039/c2cc30549f>

24. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E., GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, 2015; 1-2: 19-25.



25. Pronk S., Pall S., Schulz, R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J. C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E., GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit, *Bioinformatics*, 2013; 29 (7): 845-54.
26. Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E., GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2008; 4 (3): 435-447.
27. Schmid N., Eichenberger A.P., Choutko A., Riniker S., Winger M., Mark, A.E., van Gunsteren W.F., Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7, *Eur Biophys J.*, 2011; 40(7): 843-856.
28. Malde A.K., Zuo L., Breeze M., Stroet M., Poger D., Nair P.C., Oostenbrink C., Mark A.E., An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2011; 7(12): 4026-4037.
29. Koziara K.B., Stroet M., Malde A.K., Mark A.E., Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2014; 28(3): 221-223.
30. Iitaka Y., The crystal structure of [gamma]-glycine, *Acta Crystallographica*, 1961; 14(1): 1-10. <https://doi.org/doi:10.1107/S0365110X6100012>
31. Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R., Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *Journal of Cheminformatics*, 2012; 4 (8): 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
32. GLYCIN01 : Glycine Space Group: P 32 (145), Cell: a 7.037Å b 7.037Å c 5.483Å , α 90° β 90° γ 119.99999999999999
33. Sanner M.F., Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graph. Model*, 1999; 17(1): 57-61.
34. Brunner H., Tsuno T., Balázs G., Chiral Selectivity in the Achiral Amino Acid Glycine, *The Journal of Organic Chemistry*, 2019; 84 (24): 16199-16203. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b02726>
35. Zinovyev I., Ermolaeva E., Sharafutdinova Y., Gilfanova E., Khalilov L., Pavlova I., Guskov, V., Manifestation of Supramolecular Chirality during Adsorption on CsCuCl³ and γ -Glycine Crystals, *Symmetry*, 2023; 15 (2): 498.

Информация об авторах / Information about the authors

Р.Х. Шаяхметова – к.х.н., научный сотрудник ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», Уфа, Россия

В.Ю. Гуськов – д.х.н., и.о. заведующего кафедрой аналитической химии ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», Уфа, Россия

R.Kh. Shayakhmetova – Candidate of Chemical Sciences, researcher at the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ufa University of Science and Technology», Ufa, Russia, E-mail: shayakhmetovarh@gmail.com

V.Yu. Guskov – Doctor of Chemical Sciences, acting. Head of the Department of Analytical Chemistry, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ufa University of Science and Technology», Ufa, Russia, E-mail: guskov@mail.ru

Статья поступила в редакцию 04.04.2024; одобрена после рецензирования 16.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 04.04.2024; approved after reviewing 16.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 621.039.743:546.799.4/5:552.523

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12238

Влияние продуктов выщелачивания натрий-алюмофосфатного стекла на сорбционное поведение глин по отношению к радионуклидам

Юлия Витальевна Коневник[✉], Константин Валентинович Мартынов,
Сергей Алексеевич Кулюхин, Елена Васильевна Захарова

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Москва, Россия,

leonenko@gmail.com[✉]

Аннотация. В работе представлены результаты исследования сорбции радионуклидов ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{233}U , ^{237}Np , ^{239}Pu , ^{241}Am из модельной подземной воды, модельного выщелата алюмофосфатного стекла и растворов Na_2HPO_4 различной концентрации на бентонитовых глинах месторождений Камалинское (Красноярский край), 10й Хутор (респ. Хакасия) и Динозавровое (респ. Казахстан). Показано, что присутствие продуктов выщелачивания алюмофосфатного стекла в составе жидкой фазы уменьшает сорбционную активность глин по отношению к цезию. Коэффициенты распределения стронция в большей степени зависят от свойств глины, чем от состава жидкой фазы, однако с увеличением концентрации фосфат-иона наблюдается повышение прочности удерживания сорбированного стронция глиной. Сорбция урана, нептуния, плутония и америция увеличивается в присутствии компонентов выщелачиваемых из алюмофосфатной стеклоподобной матрицы, а прочность их фиксации глиной возрастает.

Ключевые слова: глина, бентонитовые глины, выщелат, подземная вода, последовательное выщелачивание, фосфат, сорбция, радионуклиды, цезий, стронций, уран, нептуний, плутоний, америций.

Для цитирования: Коневник Ю.В., Мартынов К.В., Кулюхин С.А., Захарова Е.В. Влияние продуктов выщелачивания натрий-алюмофосфатного стекла на сорбционное поведение глин по отношению к радионуклидам // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 364-372. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12238>

Original article

Influence of Na-Al phosphate glass leachates in clays sorption behavior toward radionuclides

Yulia V. Konevnik, Konstantin V. Martynov, Sergey A. Kulyukhin, Elena V. Zakharova

Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry Russian academy of science, Moscow, Russia,

leonenko@gmail.com[✉]

Abstract. The article presents the results of the study of the sorption of ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{233}U , ^{237}Np , ^{239}Pu , and ^{241}Am radionuclides from model groundwater, model leachate of aluminophosphate glass and Na_2HPO_4 solutions of different concentrations on bentonite clays of Kamalinskoye (Krasnoyarsk Territory), Desyaty Khutor (Republic of Khakassia), and Dinovavrovoye (Republic of Kazakhstan) deposits. We determined that the presence of aluminophosphate glass leachate in the liquid phase reduced the sorption activity of the studied clays towards caesium. The distribution coefficients of strontium depend more on the clay properties than on the liquid phase composition. However, with increasing concentration of phosphate ion, we observed an increase in the strength of sorbed strontium retention by clay. The sorption of uranium, neptunium, plutonium and americium, increased in the presence of components leached from the aluminophosphate glass-like matrix, and the strength of their fixation by clay increased.

Keywords: sorption, bentonite, clay, sequential extraction, cesium, strontium, uranium, neptunium, plutonium americium.



For citation: Konevnik Yu.V., Martynov K.V., Kulyukhin S.A., Zakharova E.V. Influence of Na-Al phosphate glass leachates in clays sorption behavior toward radionuclides. *Sorbtionnyye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 364-372. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12238>

Введение

В соответствии с требованиями концепции захоронения радиоактивных отходов 1 и 2 классов должна быть сооружена многобарьерная защитная система, ограничивающая миграцию радионуклидов в окружающую среду. Такая система включает в себя инженерные противомиграционные и противofiltrационные барьеры безопасности, матрицу, включающую радионуклиды, контейнеры, бентонитовую засыпку и вмещающий массив горных пород.

Алюмофосфатное стекло используют в качестве матрицы для отверждения жидких радиоактивных отходов высокой степени активности (ВАО), хранящихся в емкостях хранилищах ПО «Маяк». К середине 2020 года на ПО «Маяк» было наработано около 7800 тонн ВАО, заключенных в алюмофосфатную матрицу. Отвержденные по этой технологии ВАО предполагается захоранивать в проектируемом пункте глубинного захоронения радиоактивных отходов, далее ПГЗРО, на участке Енисейский Нижнеканского горного массива [1]. Глинистые материалы, благодаря их уникальным свойствам, являются чрезвычайно перспективными для применения в качестве материалов инженерных барьеров безопасности (ИББ) [2, 3].

Миграция радионуклидов за пределы хранилища возможна при нарушении защитных свойств барьеров. В этом случае возникает контакт подземной воды и отвержденных ВАО. В результате такого контакта возможно выщелачивание радионуклидов и макрокомпонентов матрицы и их последующая миграция с подземными водами. Состав выщелата в значительной степени зависит от свойств ИББ и температуры среды [4-6]. Главными компонентами выщелачивания фосфатной матрицы являются ионы натрия и

фосфат-ионы, исследование влияния которых на сорбционное поведение радионуклидов при их взаимодействии с барьерными глинистыми материалами является целью данной работы.

Экспериментальная часть

В качестве барьерных материалов использовали дисперсные глинистые материалы, приготовленные из восковидного бентонита Камалинского месторождения (Красноярский край), бентонита месторождения «10-й Хутор» (Хакасия), бентонита Динозаврового месторождения (респ. Казахстан). Далее в таблицах и на рисунках эти глины будут обозначаться как **К**, **Х** и **Д** соответственно. Минеральный и химический состав глин приведен в [7, 8]. Следует отметить, что в составе Камалинского и Хакасского бентонитов монтмориллонит находится преимущественно в Са-форме, тогда как в бентоните Динозаврового месторождения значительное его количество присутствует в Na-форме.

Сорбцию радионуклидов проводили из модельной подземной воды (ПВ), модельного выщелата (МВ) алюмофосфатного стекла (АФС), далее по тексту подземная вода и выщелат, а также из растворов NaH_2PO_4 с концентрацией 0.002, 0.02 и 0.24 моль/дм³, что соответствует концентрации фосфора 62, 620 и 7440 мг/дм³. Обозначения проведенных экспериментов приведены в табл. 1.

Состав ПВ (мг/дм³): HCO_3^- – 197.5; Cl^- – 47.9; SO_4^{2-} – 27.3; Na^+ – 74.5; Ca^{2+} – 26.9; Mg^{2+} – 6.8 был выбран из [9]. МВ готовили путем добавления $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и солей имитаторов радиоактивных отходов к ПВ [7]. Содержание основных компонентов в МВ составляло (мг/дм³): Na – 271; Mg – 189; K – 13.8; Ca – 5.72; P – 45.1; S – 38.2, Si – 0.9. Состав модельного выщелата определялся методами масс-спек

Таблица 1. Перечень использованных глин и серий проведенных сорбционных экспериментов с радионуклидами ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{233}U , ^{237}Np , ^{239}Pu , ^{241}Am .

Table 1. List of studied clays and series of sorption experiments with ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{233}U , ^{237}Np , ^{239}Pu , and ^{241}Am radionuclides

Порода, материал	Модельный раствор	Обозначение серий экспериментов
Бентонит природный, Камалинское месторождение (Красноярский край), К	ПВ	КПВ
	МВ	КМВ
Бентонит природный, месторождение 10й Хутор, (респ. Хакассия), Х	ПВ	ХПВ
	МВ	ХМВ
Бентонит природный, Динозавровое месторождение (респ. Казахстан), Д.	ПВ	ДПВ
	МВ	ДМВ

трометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП МС) на масс-спектрометре Elan-6100 (Perkin Elmer, США) и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП АЭС) на эмиссионном спектрометре Optima-4300 DV (Perkin-Elmer, США).

Непосредственно перед проведением экспериментов в растворы ПВ и МВ вводили аликвоты азотнокислых растворов радионуклидов, после чего рН полученных растворов доводили до значения 7.8 ± 0.1 растворами NaOH и HNO_3 различных концентраций. Начальные концентрации радионуклидов в растворах, из которых проводили сорбцию, составляли (М): $^{90}\text{Sr} - 1.8 \cdot 10^{-10}$; $^{137}\text{Cs} - 5.1 \cdot 10^{-10}$; $^{233}\text{U} - 1.2 \cdot 10^{-6}$; $^{237}\text{Np} - 7.3 \cdot 10^{-6}$; $^{239}\text{Pu} - 1.5 \cdot 10^{-7}$; $^{241}\text{Am} - 1.4 \cdot 10^{-8}$.

Концентрацию радионуклидов ^{90}Sr , ^{233}U , ^{237}Np , ^{239}Pu , ^{241}Am в жидкой фазе определяли методом жидкостно-сцинтилляционного счета на автоматическом жидко-сцинтилляционном низкофоновом альфа-бета-спектрометре Tri-Carb 3180TR/SL для измерения сверхмалых количеств альфа- и бета-излучателей (Perkin Elmer, США) с использованием сцинтиллятора OptiphaseHisafe3 (Perkin Elmer, США) в соотношении сцинтиллятор:аликвота = 10:1. Аликвоты, содержащие ^{90}Sr , предварительно выдерживали в течение 14 дней для установления равновесия между ^{90}Sr и ^{90}Y . Концентрация ^{137}Cs определялась методом гамма-спек-

трометрии на цифровом γ -спектрометрическом комплексе с коаксиальным детектором GEM30 фирмы АМТЕК (ORTEC).

Сорбционные свойства глин исследовали в статических условиях при соотношении массы твердой фазы к объему раствора, равном $1\text{г} : 20\text{см}^3$ и периодическом перемешивании. Сорбционные эксперименты проводили до достижения равновесия в исследованных системах (4 недели).

Распределение форм нахождения радионуклида, сорбированного на образцах бентонитов, определяли методом последовательного выщелачивания по модифицированной схеме Тессьера [10]. Схема выщелачивания приведена в табл. 2. Радионуклиды, выщелачиваемые на IV и V стадиях, относят к прочнофиксированным формам, а выщелачиваемые на I и II стадиях – к подвижным мобильным формам радионуклидов. Выщелачиваемый на III стадии радионуклид относится к условно подвижным формам. В ПГЗРО наступление условий, при которых матрица РАО и глиняный барьер будут контактировать с раствором, содержащим уксусную кислоту и гидроксиламина хлорид, нереально. Вследствие этого формы, выщелачиваемые на III стадии, также можно отнести к прочнофиксированным.

Обсуждение результатов

Для оценки влияния продуктов выщелачивания алюмофосфатной матрицы на

Таблица 2. Схема последовательного выщелачивания [10]

Table 2. Sequential extraction scheme [10]

Стадия	Геохимическая форма нахождения радионуклидов	Реагенты	Время контакта фаз, час/т°С
I	Водорастворимая	Модельная подземная вода	1/20
II	Обменная	1М NH ₄ Ac; pH= 5.0	1/20
III	Поверхностное комплексообразование, Fe/Mn оксиды и пленки	0.4М NH ₂ ОН.НCl в 25% CH ₃ COOH	6/80
IV	Кислоторастворимая	6М HCl	1/20
V	Нерастворимая в кислотах *	Без обработки	-

Таблица 3. Коэффициенты распределения радионуклидов (см³/г) на глинах из модельной подземной воды (ПВ) и модельного выщелата (МВ).

Table 3. Distribution coefficients (cm³/g) of radionuclides from synthetic groundwater and synthetic leachate in clay

Бентонит	Cs		Sr		U	
	ПВ	МВ	ПВ	МВ	ПВ	МВ
К	1.6·10 ⁴	1.4·10 ³	2.1·10 ²	2.6·10 ²	3.0·10 ¹	1.9·10 ⁴
Х	5.1·10 ³	6.5·10 ²	8.0·10 ²	7.3·10 ²	4.1·10 ¹	1.7·10 ²
Д	1.9·10 ³	7.5·10 ²	8.1·10 ²	5.8·10 ²	5.2·10 ¹	1.5·10 ³
Бентонит	Np		Pu		Am	
	ПВ	МВ	ПВ	МВ	ПВ	МВ
К	3.7·10 ¹	2.7·10 ³	5.0·10 ³	1.2·10 ⁴	1.5·10 ⁴	2.5·10 ⁴
Х	4.6·10 ¹	3.3·10 ³	5.6·10 ³	1.5·10 ⁴	1.7·10 ⁴	1.8·10 ⁴
Д	3.1·10 ¹	3.2·10 ²	7.7·10 ³	1.4·10 ⁴	1.0·10 ⁴	1.4·10 ⁴

поведение радионуклидов проведены сорбционные эксперименты на различных бентонитовых глинах с использованием ПВ и МВ. Полученные значения коэффициентов распределения радионуклидов приведены в табл. 3.

Сорбция ¹³⁷Cs на глинах в присутствии компонентов выщелачивания матрицы снижается. На Камалинском и Хакасском бентонитах коэффициенты распределения уменьшаются на порядок, а на Динозавровом бентоните – в разы. Фосфат цезия хорошо растворим в воде и не образует комплексных соединений. Уменьшение сорбированного на образцах глин цезия можно объяснить влиянием ионной силы раствора выщелата, которая определяется в первую очередь ионами Na⁺ и HPO₄²⁻. Коэффициент распределения цезия может уменьшаться на несколько порядков с увеличением ионной силы раствора, что подтверждается в работах [11, 12].

Сравнение форм нахождения цезия, сорбированного из ПВ и МВ, показывает, что основное количество цезия (более 80%) находится в прочнофиксированной форме (стадии IV+V), но при сорбции из МВ количество прочнофиксированных форм цезия уменьшается (рис. 1 а). Увеличение концентрации фосфат-иона практически не влияет на распределение форм нахождения радионуклида (рис. 2 а). Основное количество цезия остается в прочнофиксированной форме (стадии IV+V).

Присутствие в составе жидкой фазы продуктов выщелачивания АФС, не приводит к значимому изменению количества сорбированного ⁹⁰Sr в отличии от ¹³⁷Cs (табл. 3). Распределение форм нахождения стронция практически не зависит от состава раствора, из которого проводили сорбцию (рис. 1 б). До 80% ра-

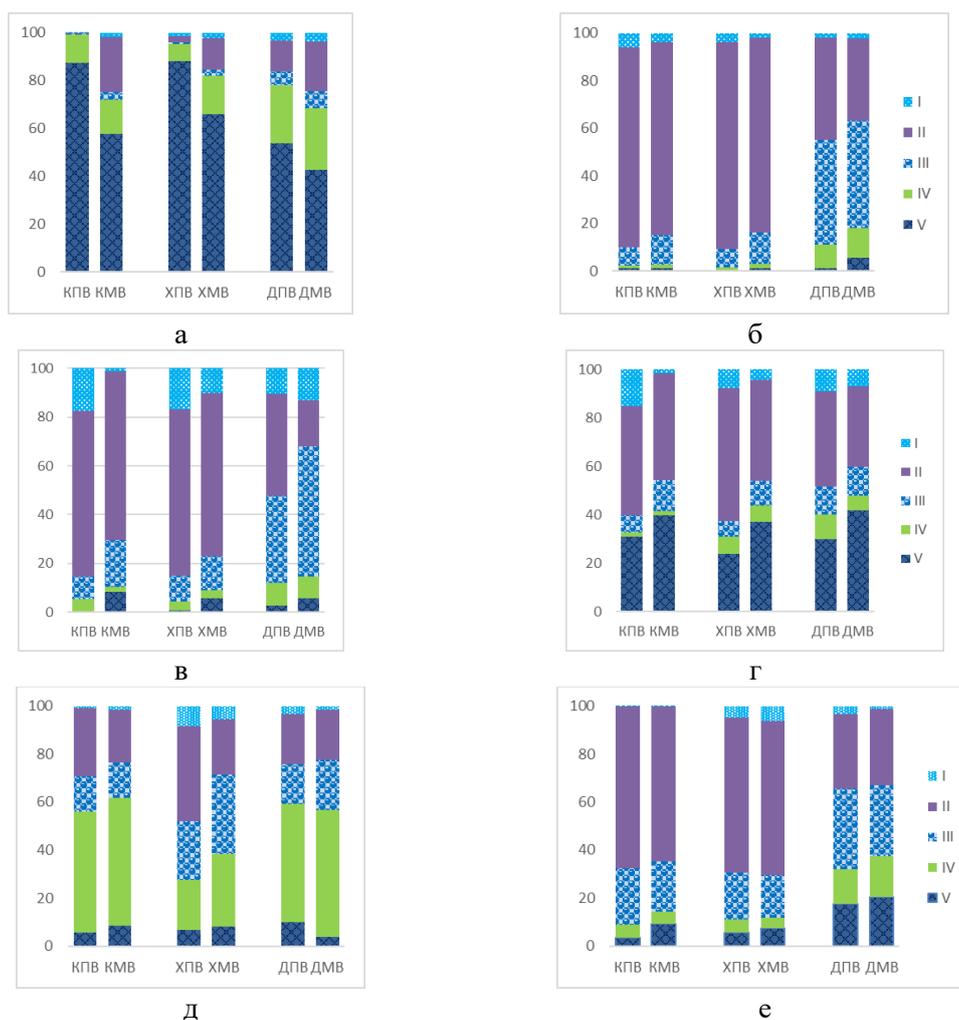


Рис. 1. Распределение форм нахождения (в % от сорбированного) цезия (а), стронция (б), урана (в), нептуния (г), плутония (д) и америция (е) сорбированных из модельной подземной воды (Н) и модельного выщелата (В) на образцах глин месторождений Камалинского, 10й хутор (респ. Хакасия) и Динозаврового.

Fig. 1. Distribution of forms (% of the sorbed amount) of caesium (a), strontium (b), uranium (c), neptunium (d), plutonium (e), and americium (f) sorbed from synthetic groundwater (H) and synthetic leachate (B) on clay samples from the Kamalinskoye, 10th Khutor (Republic of Khakassia), and Dinozavrovoye deposits

дионуклида, сорбированного на Камалинском и Хакасском бентонитах, находится в обменной форме (стадия II), на Динозавровом бентоните это значение в два раза меньше. Возможно, это связано с тем, что Динозавровый бентонит находится преимущественно в Na-форме, и имеет меньшие значения межслоевого расстояния [13].

Количество радионуклида в прочно-фиксированной форме (стадии IV+V) не превышает 20%. Следует отметить, что с увеличением концентрации фосфат-иона

при сорбции стронция на Хакасском бентоните наблюдается перераспределение форм его нахождения, при этом уменьшается доля мобильной обменной формы (рис. 2 б).

В отличие от стронция, сорбция урана и нептуния в значительной степени зависит от состава раствора (табл. 3). Присутствие продуктов выщелачивания АФС на порядки увеличивает значения коэффициентов распределения ^{233}U и ^{237}Np на исследованных глинах, кроме урана на Хакасском и нептуния на Динозавровом

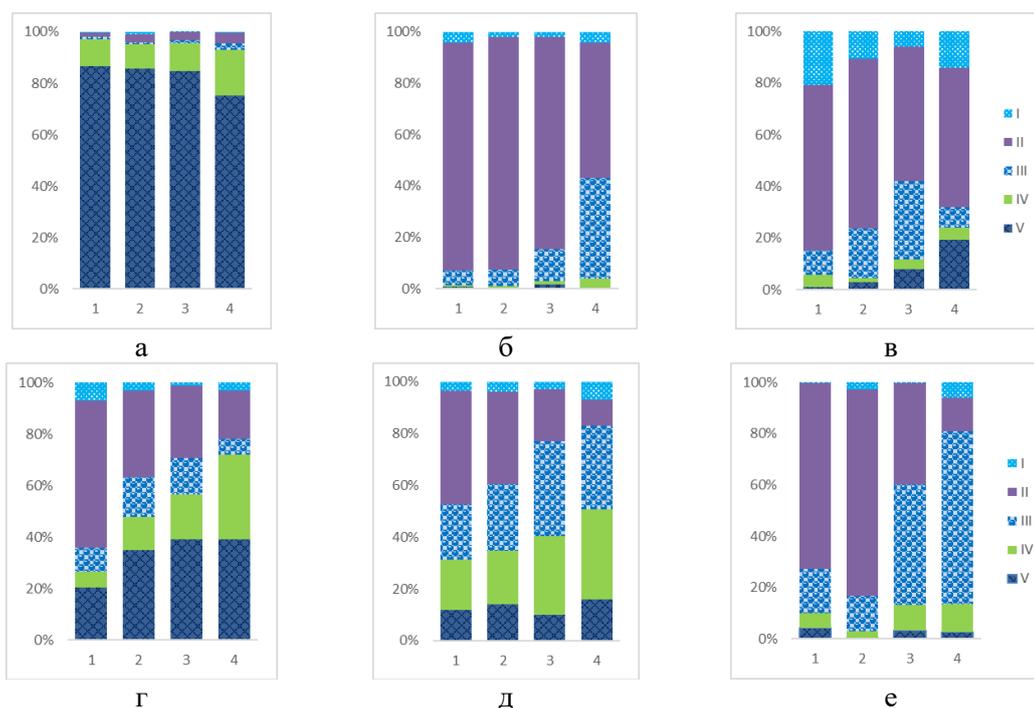


Рис. 2. Распределение форм нахождения сорбированного цезия (а), стронция (б), урана (в), нептуния (г), плутония (д) и америция (е) на бентоните месторождения 10й Хутор, респ. Хакасия из модельной подземной воды (1) и растворов NaH_2PO_4 концентрации 0.002 (столбец 2), 0.02 (столбец 3) и 0.24М (столбец 4).

Fig. 2. Distribution of forms of caesium (a), strontium (b), uranium (c), neptunium (d), plutonium (e), and americium (f) sorbed on bentonite clay from 10th Khutor (Republic of Khakassia) deposit from synthetic groundwater (1) and NaH_2PO_4 solutions with concentrations of 0.002 (column 2), 0.02 (column 3), and 0.24M (column 4)

бентонитах, для которых коэффициент распределения повышается только на порядок.

Изменение состава раствора влияет на формы нахождения сорбированного урана (рис. 1 в). В присутствии продуктов выщелачивания АФС увеличивается содержание урана, сорбированного по механизму поверхностного комплексообразования (стадия III). Количество находящегося в этой форме урана различно на глинах и изменяется от 10 до 30%. В разбавленных растворах фосфатов (рис. 2 в), соответствующих 0.002 и 0.02 М (2 и 3 столбцы на рис. 2 в), содержание урана, связанного по механизму поверхностного комплексообразования (стадия III), также увеличивается. Доля прочнофиксированного урана на глинах невысокая (стадии IV+V), что характерно для этого радионуклида. Некоторое падение доли прочнофиксированных форм (стадии

III+IV+V) при концентрации фосфат-иона, равной 0.24 М (рис 2 в, столбец 4), может быть обусловлено образованием более мобильных форм комплексных ионов урана. Однако даже в этом случае прочность удерживания урана глиной выше, чем при сорбции в отсутствие фосфат-ионов.

Помимо увеличения количества сорбированного нептуния из МВ по сравнению с ПВ на всех глинах наблюдается увеличение доли сорбированного радионуклида по механизму поверхностного комплексообразования и в прочнофиксированной форме (стадии III+IV+V) (рис. 1 г). В этом случае содержание прочнофиксированных форм составляет более 50%. С ростом концентрации фосфат-ионов такая тенденция перераспределения форм нахождения нептуния сохраня-

ется и проявляется более заметно по сравнению с аналогичными данными, полученными при сорбции из ПВ (рис. 2 г).

Продукты выщелачивания алюмофосфатного стекла не так сильно влияют на сорбцию плутония и америция, как это имеет место в случае с ураном и нептунием (табл. 3). Присутствие продуктов выщелачивания АФС влияет на распределение форм нахождения ^{239}Pu и ^{241}Am (рис. 1 д, е). Наиболее значительные изменения наблюдаются для плутония на Хакасском бентоните при сорбции из ПВ по сравнению с МВ, где увеличиваются доли радионуклида, связанного по механизму поверхностного комплексообразования (стадия III) и находящегося в прочно фиксированной форме (стадии IV+V). При увеличении концентрации фосфат-ионов эта тенденция становится более отчетливой (рис 2 д).

В случае америция влияние компонентов выщелачивания АФС при их низкой концентрации выражено менее значимо на разных глинах (рис.1 е), чем для плутония. Повышение концентрации фосфат-ионов в растворе приводит к увеличению содержания радионуклида, сорбированного по механизму поверхностного комплексообразования, при этом доля прочнофиксированных форм остается незначительной (стадии IV+V) (рис. 2 е).

При повышении концентрации фосфат-ионов в значительной степени увеличивается доля америция, выщелачиваемого на третьей стадии (рис. 2 е). На этой стадии выщелачивается радионуклид, связанный с минералами по механизму поверхностного комплексообразования. Эта фракция менее мобильна, чем II, что соответствует более прочному удерживанию радионуклида породой. Как было показано ранее, более высокие концентрации фосфат-ионов способны оказывать значительное влияние на распределение форм нахождения америция, сорбированного на бентоните месторождения 10й Хутор (респ. Хакассия) [4]. По-

добное поведение может быть обусловлено образованием комплексных ионов америция с фосфатами с их последующей сорбцией на породе, а также образованием тройных внутрисферных комплексов с фосфат-ионами и поверхностными сорбционными центрами глин, однако имеющихся данных недостаточно для корректного термодинамического моделирования форм существования америция в подобной системе.

Поведение плутония в присутствии компонентов модельного выщелата также практически не изменяется из-за изначально высоких значений коэффициентов распределения (табл. 3). Как и в случае америция наблюдается увеличение доли радионуклида, выщелачиваемого на третьей стадии, что также может свидетельствовать об образовании фосфатных комплексных соединений и их участие в последующей сорбции (рис 1 д, 2 д).

Доля плутония в прочнофиксированной форме (стадии IV+V) достигает 60% на Камалинском и Динозавровом бентонитах и для Хакасского бентонита до 40%. Для америция их содержание изменяется от 10 до 25%. Соответственно, доля плутония в обменной форме (стадия II) меньше, а америция больше. Максимальное содержание в обменной форме америция 70-80% на Камалинском, минимальное – 35% на Динозавровом бентонитах. С увеличением концентрации фосфат-иона в растворе доля прочнофиксированных форм плутония остается достаточно высокой (35-40%) по сравнению с америцием (10%) и не наблюдается тенденции к ее повышению (рис 2 д, е). Для плутония увеличивается содержание прочнофиксированной формы и значительно снижается доля обменной формы.

Заключение

Присутствие в жидкой фазе продуктов выщелачивания алюмофосфатной матрицы в значительной степени влияет на



поведение радионуклидов – как продуктов деления – стронция и цезия, так и актинидов.

Сорбция цезия на глинах незначительно падает в присутствии продуктов выщелачивания. Предположительно, это обусловлено повышением ионной силы, основной вклад в которую вносят ионы натрия и фосфата. Сорбция стронция на бентонитах в значительно большей степени зависит от свойств глины, чем от состава жидкой фазы, но с повышением концентрации фосфатов наблюдается увеличение доли прочнофиксированных форм.

Уран и нептуний в степенях окисления U(VI) и Np(V) считаются мобильными радионуклидами в условиях окружающей среды вследствие их низких коэффициентов распределения из подземной воды, которые на несколько порядков меньше соответствующих значений для плутония или америция [9]. Присутствие в составе жидкой фазы продуктов выщелачивания алюмофосфатного стекла значительно повышает их сорбцию на бентонитах и долю прочнофиксированных форм радионуклидов, что, несомненно, благоприятно сказывается на эффективности противомиграционного глинистого инженерного барьера.

Список литературы/References

1. Bogatov S.A., Blokhin P.A. Usrednennye ocenki udel'noj aktivnosti i teplovydeleniya osteklovannykh vysokoaktivnykh othodov, nakoplennykh na FGUP «РО «МАЯК». *Voprosy radiacionnoj bezopasnosti*. 2021; 3: 3-12. (In Russ)
2. Ilina O.A., Krupskaya V.V., Vinokurov S.E., Kalmykov S.N., State-of-Art in the Development and Use of Clay Materials as Engineered Safety Barriers at Radioactive Waste Conservation and Disposal Facilities in Russia. *Radioactive Waste*. 2019; 4(9): 71-84.
3. Krupskaya V.V., Biryukov D.V., Belousov P.E., Lekhov V.A., Romanchuk A.Yu., Kalmykov S.N., Use of natural clay

Плутоний и америций имеют высокие коэффициенты распределения в условиях ПГЗРО. Присутствие продуктов выщелачивания алюмофосфатного стекла лишь незначительно повышает сорбцию, при этом доля прочнофиксированных форм повышается с увеличением концентрации фосфат-ионов.

Анализируя представленные данные, можно сказать, что присутствие в жидкой фазе продуктов выщелачивания фосфатного стекла не оказывает негативного влияния на способность инженерных барьеров на основе бентонитовых глин препятствовать миграции радионуклидов за пределы хранилища РАО, а в ряде случаев значительно повышает барьерные свойства изученных материалов по отношению к таким мобильным в условиях ПГЗРО радионуклидам, как уран и нептуний.

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.

materials to increase nuclear and radiation safety of nuclear legacy facilities. *Radioactive Waste*. 2018; 3(2): 24-34.

4. Konevnik Y.V., Martynov K.V., Karaseva Ya.Yu., Rodygina N.I., Zakharova E.V. The role of phosphate released from Na-Al-P glass under repository conditions in speciation and transport of americium. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2019; 1(321): 83-89. <https://doi.org/10.1007/s10967-019-06569-8>

5. Martynov K.V., Zakharova E.V. Leaching of the Matrix with Radioactive Waste under Disposal Conditions on the Example of Model Phosphate Glass. *Radiochemistry*. 2021; 63(1): 107-118. <https://doi.org/10.1134/S1066362221010161>



6. Martynov K.V., Konstantinova L.I., Zakharova E.V. Vliyanie temperatury na vyshhelachivanie model'nogo fosfatnogo stekla s imitatorami radioaktivnykh othodov. *Voprosy radiacionnoj bezopasnosti*. 2015; 4(80): 10-21. (In Russ.)

7. Martynov K.V., Konevnik Y.V., Zakharova E.V. Diffusion of Tritium, Technetium, Cesium and Uranium from Phosphate Glass Leachates in a Pore Solution of Clay Materials. *Radiochemistry*. 2023; 4(65): 457-472.

8. Semenkov A.S. Sorbcija Cs(I), Eu(III), Np(V) na glinah razlichnogo mineral'nogo sostava: academic dissertation in Chemistry: 02.00.14. Moscow, 2019, 135 p. (In Russ.)

9. Konevnik Yu.V., Zakharova E.V., Martynov K.V., Andryushchenko N.D., Proshin I.M. Influence of temperature on the sorption properties of rocks from the Nizhnekansky massif. *Radiochemistry*. 2017; 59(3): 313-319. <https://doi.org/10.1134/S106636221703016X>

10. Konevnik Yu.V., Zakharova E.V., Martynov K.V., Shiryayev A.A. Influence of temperature on the speciation of radionu-

clides sorbed onto rocks from the Nizhnekansky massif. *Radiochemistry*. 2017; 59(3): 320-325.

11. Baklay A.A., Makovskaya N.A., Leont'yeva T.G., Kuzmuk D.A. Izuchenie mineral'nogo sostava prirodnykh glin Respubliki Belarus' i ih sorbcionnykh svojstv po otnosheniju k radionuklidam cezija i stroncija. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssy*. 2021; 2(21): 246-255. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3358> (In Russ.)

12. Semenkov A.S., Evsiunina M.V., Verma P.K., Mohapatra P.K., Petrov V.G., Seregina I.F., Bolshov M.A., Krupskaya V.V., Romanchuk A.Yu., Kalmykov S.N. Cs⁺ sorption onto Kutch clays: Influence of competing ions. *Applied Clay Science*. 2018; 166: 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.09.010>

13. Krupskaya V.V., Zakusin S.V., Chernov M.S., Tyupina E.A. Osobennosti sorbcii cezija v bentonitovykh bar'ernykh sistemah pri zahoroneni tverdykh radioaktivnykh othodov. *Gornyj zhurnal*. 2016; 2: 79-85. <https://doi.org/10.17580/gzh.2016.02.16> (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Ю.В. Коневник – научный сотрудник лаборатории радиационного контроля и экологических проблем обращения с радиоактивными и токсичными отходами ИФХЭ РАН, Москва, Россия

К.В. Мартынов – к.г.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории радиационного контроля и экологических проблем обращения с радиоактивными и токсичными отходами ИФХЭ РАН, Москва, Россия

С.А. Кулюхин – д.х.н., заведующий лабораторией физико-химических методов локализации радиоактивных элементов ИФХЭ РАН, Москва, Россия

Е.В. Захарова – к.х.н., заведующая лабораторией радиационного контроля и экологических проблем обращения с радиоактивными и токсичными отходами ИФХЭ РАН, Москва, Россия

Yu.V. Konevnik – Researcher at the Laboratory of Radiation Control and Environmental Problems of Radioactive and Toxic Waste Management, IPCE RAS, Moscow, Russia, leonenko@gmail.com

K.V. Martynov – PhD, Leading Researcher at the Laboratory of Radiation Control and Environmental Problems of Radioactive and Toxic Waste Management, IPCE RAS, Moscow, Russia

S.A. Kulyukhin – Doctor of Chemical Sciences, Head of the Laboratory of Physico-Chemical Methods of Localization of Radioactive Elements IPCE RAS, Moscow, Russia

E.V. Zakharova – PhD, Head of the Laboratory of Radiation Control and Environmental Problems of Radioactive and Toxic Waste Management, IPCE RAS, Moscow, Russia

Статья поступила в редакцию 25.03.2024; одобрена после рецензирования 24.04.2024; принята к публикации 15.05.2024.

The article was submitted 25.03.2024; approved after reviewing 24.04.2024; accepted for publication 15.05.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12239

Особенности удерживания азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ-МС

Оксана Игоревна Гриневич[✉],

Анастасия Юрьевна Шолохова, Дмитрий Дмитриевич Матюшин

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия,

oksigrinevich@gmail.com[✉]

Аннотация. Ароматические пяти- и шестичленные азотсодержащие гетероциклические соединения являются биологически активными веществами и находят широкое применение в биохимии и медицине. Кроме того, подобные соединения известны в качестве экотоксикантов, образующихся в ходе окислительных процессов в промышленных сточных водах. Для определения азотсодержащих гетероциклов в различных сложных смесях широко используется высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия, в которой октадецилсиликагель является основным сорбентом для хроматографического разделения. Однако, октадецилсиликагель не всегда позволяет достичь удовлетворительного разделения в случае присутствия сильнополярных изомерных молекул, и необходимо использование более селективных хроматографических подходов. Одним из таких является гидрофильная хроматография, которая позволяет разделять полярные соединения.

Целью работы является сравнительная характеристика удерживания ряда пяти- и шестичленных азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Дополнительно осуществлялось спектрофотометрическое детектирование при длине волны 210 нм. Для достижения цели работы использовались сорбенты на основе октадецил- и непривитого силикагеля. Масс-спектрометрическое детектирование высокого разрешения осуществлялось в режиме электрораспылительной ионизации. Объектом исследования стали 19 азотсодержащих гетероциклических соединений. Использовались водно-ацетонитрильные подвижные фазы с добавлением водных растворов муравьиной кислоты и диэтиламина в качестве кислотно-основных модификаторов. Раствор формиата аммония применялся в качестве модификатора в режиме гидрофильной хроматографии. В режиме обращенно-фазовой хроматографии показано, что введение 0.1% водного раствора муравьиной кислоты улучшает ионизацию и интенсивность сигнала масс-спектрометра, однако не всегда позволяет добиться удовлетворительного разделения изомеров при элюировании с поверхности октадецилсиликагеля. Введение 0.01% раствора диэтиламина не дает выраженного улучшения в разделении по сравнению с подвижной фазой без модификаторов. Использование непривитого силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии позволяет разделять изомерные пятичленные гетероциклы с получением узких симметричных пиков, но не приводит к селективному разделению изомерных диазинов.

Таким образом, в работе изучено удерживание 19 азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной жидкостной хроматографии при ионизации электрораспылением. Установлено, что метод гидрофильной хроматографии на непривитом силикагеле позволяет удовлетворительно разделять изомерные пятичленные гетероциклические соединения разных классов. Для разделения шестичленных гетероциклов удовлетворительное разделение достигается при элюировании с поверхности октадецилсиликагеля водно-ацетонитрильной подвижной фазой без модификаторов.

Ключевые слова: азотсодержащие гетероциклические соединения, высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, гидрофильная хроматография

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-73-10053), предоставленного Институту физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук, <https://rscf.ru/project/22-73-10053/>

Для цитирования: Гриневич О.И., Шолохова А.Ю., Матюшин Д.Д. Особенности удерживания азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ-



Original article

The retention features of nitrogen-containing heterocyclic compounds in reversed-phase and hydrophilic HPLC-MS modes

Oksana I. Grinevich[✉], Anastasia Yu. Sholokhova, Dmitriy D. Matyushin

Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, oksigrinevich@gmail.com[✉]

Abstract. Aromatic five- and six-membered nitrogen-containing heterocyclic compounds are biologically active substances and are widely used in biochemistry and medicine. In addition, such compounds are known as ecotoxicants formed during oxidation processes in industrial wastewater. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry is widely used to determine nitrogen-containing heterocycles in various complex mixtures. Octadecyl silica gel is the main sorbent for chromatographic separation. However, octadecyl silica gel does not always enable satisfactory separation in the presence of highly polar isomeric molecules, and more selective chromatographic approaches are required. One of these is hydrophilic chromatography, which facilitates the separation of polar compounds.

The aim of the study was to comparatively characterize the retention of a number of five- and six-membered nitrogen-containing heterocyclic compounds during reversed-phase and hydrophilic liquid chromatography with mass spectrometric detection. In addition, spectrophotometric detection at a wavelength of 210 nm was carried out. In the study, we used sorbents based on octadecyl silica gel and unmodified silica gel. High-resolution mass spectrometry was used in the electrospray ionization mode. We studied 19 nitrogen-containing heterocyclic compounds. We used aqueous acetonitrile mobile phases with added aqueous solutions of formic acid and diethylamine as acid-base modifiers. An ammonium formate solution was used as a modifier during hydrophilic chromatography. Reversed-phase chromatography showed that the introduction of 0.1% aqueous formic acid solution increased the ionization and the mass spectrometer signal intensity, but did not always result in a satisfactory separation of isomers upon elution from the octadecyl silica gel surface. The introduction of 0.01% diethylamine solution provided no significant improvement in the separation compared to the mobile phase without modifiers. The use of unmodified silica gel in hydrophilic chromatography mode allowed us to separate isomeric five-membered heterocycles, which was demonstrated by narrow symmetric peaks, but did not result in selective separation of isomeric diazines.

Thus, we studied the retention of 19 nitrogen-containing heterocyclic compounds using reversed-phase and hydrophilic liquid chromatography with electrospray ionisation. It was determined that hydrophilic chromatography on unmodified silica gel could be used for satisfactory separation of isomeric five-membered heterocyclic compounds of different classes. For six-membered heterocycles, satisfactory separation was achieved by elution from the surface of octadecyl silica gel using aqueous acetonitrile mobile phase without modifiers.

Keywords: nitrogen-containing heterocyclic compounds, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, reversed-phase high-performance liquid chromatography, hydrophilic chromatography

Acknowledgements: The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation (project No. 22-73-10053) to the Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, <https://rscf.ru/project/22-73-10053/>

For citation: Grinevich O.I., Sholokhova A. Yu., Matyushin D.D. The retention features of nitrogen-containing heterocyclic compounds in reversed-phase and hydrophilic HPLC-MS modes. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 373-385. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12239>

Введение

Азотсодержащие гетероциклические соединения образуют ряд классов органических соединений, которые объединяет наличие атомов азота в структуре ароматического или алициклического

ядра. Подобные соединения широко распространены в природе и большинство из них имеют выраженную биологическую активность. Наибольшее практическое применение в настоящее время имеют ароматические пяти- и шестичленные гетероциклы, имеющие в своем составе по



одному или несколько атомов азота. Многочисленные производные подобных структур являются лекарственными препаратами, ингибиторами коррозии и компонентами органического синтеза [1]. С другой стороны, различные азотсодержащие гетероциклы могут образовываться в результате сложных окислительных трансформаций в объектах окружающей среды по причине загрязнения отходами нефтяной [2] и ракетной [3-5] промышленности. В связи с этим, актуальна разработка современных методик идентификации и разделения смесей, содержащих азотистые гетероциклы. Повсеместно растущая популярность высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) привела к тому, что на сегодняшний день ВЭЖХ-МС является ведущим методом для решения данной задачи [6-10].

На текущий момент подавляющее большинство анализов проводится с использованием стандартных колонок, заполненных октадецилсиликагелем (ОДС) [11,12]. Однако, в случае изомеров положения заместителей или различного расположения атомов азота в гетероциклическом ядре, идентификация затруднена, если не достигнуто эффективное хроматографическое разделение. В связи с этим, актуальными остаются исследования, посвященные нахождению закономерностей между структурой сорбирующегося вещества и природой сорбента. Богатое электронами гетероциклическое ядро проявляет донорно-акцепторные свойства [13], что позволяет взаимодействовать с поверхностью неподвижных фаз за счет как дисперсионных, так и специфических взаимодействий [14-16].

В последние годы, наравне с классической обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ) активно развивается хроматография гидрофильных взаимодействий или гидрофильная хроматография, широко известная как HILIC (Hydrophilic

interaction liquid chromatography). В отличие от ОФ ВЭЖХ, HILIC использует гидрофильные сорбенты, обычно представляющие собой силикагель, немодифицированный или содержащий химически связанные с поверхностью полярные группы, в то время как смеси с высокой долей органического растворителя применяются в качестве подвижной фазы [17]. HILIC считается «промежуточным» методом между обращенно- и нормально-фазовой ВЭЖХ, однако все еще ведутся исследования по установлению механизма удерживания в гидрофильной хроматографии. Основным считается перераспределение между насыщенной органическим растворителем подвижной фазой и насыщенной адсорбированной водой неподвижной фазой, однако свой вклад также могут вносить электростатические взаимодействия и водородные связи [18,19]. Благодаря такому смешанному механизму HILIC позволяет разделять полярные соединения, в том числе молекулы малого размера, которые слабо или вообще не удерживаются в обращенно-фазовой ВЭЖХ [17,20,21]. В том числе, это касается азотсодержащих гетероциклических соединений, таких как 1,2,4-триазолы [22].

В связи с этим, целью настоящей работы стала сравнительная характеристика удерживания ряда пяти- и шестичленных азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой ВЭЖХ и HILIC в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием.

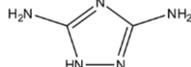
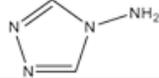
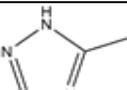
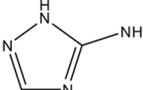
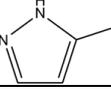
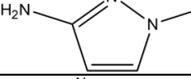
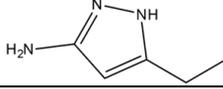
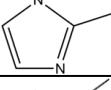
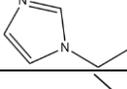
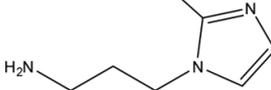
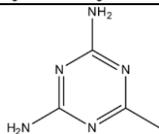
Экспериментальная часть

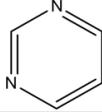
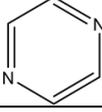
Для изучения удерживания в настоящей работе были использованы химические стандарты девятнадцати азотсодержащих гетероциклических соединений (Sigma Aldrich, США). Структурные формулы соединений приведены в таблице 1.

Для приготовления подвижной фазы

Таблица 1. Исследуемые азотсодержащие гетероциклические соединения

Table 1. Nitrogen-containing heterocyclic compounds studied

№	Название	Структурная формула	Молекулярная масса, Да
1	2	3	4
1	1H-1,2,4-триазол		69.03
2	1H-1,2,4-триазол-3,5-диамин		99.05
3	4-амино-4H-1,2,4-триазол		84.04
4	3-метил-1H-1,2,4-триазол		83.05
5	1H-1,2,3-триазол		69.03
6	3-амино-1H-1,2,4-триазол		84.04
7	1H-пиразол		68.03
8	3-метил-1H-пиразол		82.05
9	1-метил-3-амино-1H-пиразол		97.06
10	5-этил-1H-пиразол-3-амин		111.08
11	1H-имидазол		68.03
12	2-метил-1H-имидазол		82.05
13	1,2-диметил-1H-имидазол		96.07
14	1-этил-1H-имидазол		96.07
15	3-(2-метилимидазол-1-ил)пропан-1-амин		139.11
16	6-метил-1,3,5-триазин-2,4-диамин		125.07
17	пиридазин		80.04

1	2	3	4
18	пиримидин		80.04
19	пиразин		80.04

использовалась деионизованная вода, полученная с помощью системы водочистки АКВАЛАБ AL PLUS (Россия), и ацетонитрил категории чистоты «для ВЭЖХ-МС» (PanReac AppliChem, Германия). В качестве добавок в подвижную фазу использовались муравьиная кислота (НСООН), диэтиламин ($C_2H_5NHC_2H_5$, ДЭА) и формиат аммония (NH_4CO_2).

Эксперимент выполнен с применением хроматографической системы Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), оснащенной кватернарным насосом, дегазатором, автосэмплером, ячейкой термостатирования колонки и спектрофотометрическим многоволновым детектором. Удерживание в режиме ОФ ВЭЖХ осуществлялось на колонке InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (Agilent Technologies, США), заполненной ОДС (100 мм × 4.6 мм, размер частиц 2.7 мкм). Удерживание в режиме гидрофильной хроматографии проводилось на колонке InfinityLab Poroshell 120 Hilic (Agilent Technologies, США), заполненной силикагелем (100 мм × 4.6 мм, размер частиц 2.7 мкм). Для ОФ ВЭЖХ использовались следующие подвижные фазы: вода/ацетонитрил, 0.1% водный раствор НСООН/0.1% раствор НСООН в ацетонитриле, 0.01% водный раствор ДЭА/0.01% раствор ДЭА в ацетонитриле. Подвижная фаза для гидрофильной хроматографии: 5 мМ водный раствор формиата аммония/ацетонитрил.

Использовались градиентные режимы элюирования:

1. Режим ОФ ВЭЖХ: повышение содержания ацетонитрила от 5 до 100% в

интервале 0-20 мин. Расход подвижной фазы 0.25 см³/мин.

2. Режим гидрофильной хроматографии: понижение содержания ацетонитрила от 90 до 5% в интервале 0-30 мин. Расход подвижной фазы 0.4 см³/мин.

Определение времени выхода несорбируемого вещества t_M проводилось следующим образом:

1. Режим ОФ ВЭЖХ: по удерживанию нитрита натрия (при элюировании подвижными фазами вода/ацетонитрил и 0.01% водный раствор ДЭА/0.01% раствор ДЭА в ацетонитриле) и по системному пику масс-детектора (при элюировании подвижной фазой 0.1% водный раствор НСООН/0.1% раствор НСООН в ацетонитриле).

2. Режим гидрофильной хроматографии: по удерживанию ацетона.

Все эксперименты проводились при постоянной температуре колонки 25°C и объеме ввода пробы 1 мкл. Спектрофотометрическое детектирование сорбатов проводилось при длине волны 210 нм.

Масс-спектрометрическое детектирование проводилось с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра высокого разрешения Bruker Maxis Impact QTOF (Bruker Daltonics, Германия). Ионизация выполнялась в режиме электрораспыления, в качестве газа-распылителя и осушителя использовался азот. Применялся режим регистрации положительных ионов с диапазоном сканирования масс $m/z = 50-500$; температура источника ионизации составляла 250°C; расход газа-осушителя – 7 дм³/мин; давление газа-распылителя – 1.4 бар; подаваемое напряжение – 4500 В.

Внешняя калибровка масс-детектора проводилась путем введения формиата натрия через устройство прямого ввода. Статистическое отклонение определения массы не превышало 0.03 ppm.

Для управления хромато-масс-спектрометрической системой и обработки полученных данных применялось программное обеспечение Compass NuStar software (Bruker Daltonics, Германия).

Обсуждение результатов

По результатам хроматографического эксперимента были рассчитаны факторы удерживания k гетероциклических соединений по формуле [23]:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Значения для всех изученных систем приведены в таблице 2. Согласно полученным значениям, можно сделать вывод, что большинство соединений имеют слабое удерживание во всех рассматриваемых системах ($k \leq 1$), особенно это касается триазолов, которые крайне гидрофильны и подвержены раннему элюированию. Тем не менее, режим гидрофильной хроматографии демонстрирует более эффективное разделение по сравнению с сорбцией на ОДС, особенно для имидазолов и соединений, содержащих аминогруппы в качестве заместителей. Для последних усиление удерживания на гидрофильном сорбенте является следствием увеличения полярности молекул, а также реализации водородных связей аминогрупп с силанольными группами на поверхности сорбента. Что касается различия удерживания изомерных имидазолов и пиразолов, то, как было показано авторами ранее [24], в ядре имидазола оба атома азота являются акцепторами электронов, в отличие от пиразола, в котором электронная плотность более делокализована. Соответственно, имидазолы будут удерживаться дольше за счет более выраженных диполь-дипольных взаимодействий. Для изомерных диазинов пиридазин демонстрирует несколько более

выраженное удерживание на силикагеле по сравнению с пиримидином и пиразином, что также связано с меньшей флуктуацией заряда в ядре и более выраженным диполем, ориентированным в сторону соседних атомов азота [25].

Было проведено сравнение селективности привитого и непривитого силикагелей по отношению к некоторым парам сорбатов путем расчета коэффициента селективности по формуле [23]:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Полученные значения коэффициентов селективности приведены в таблице 3. Согласно полученным результатам, для отдельных пар изомерных гетероциклов гидрофильный силикагель демонстрирует большую селективность, а именно для изомеров положения атома азота в ароматическом ядре. Наиболее выражен эффект для структур с пятичленным гетероароматическим ядром, в то время как для диазинов природа сорбента гораздо менее значима. В то же время, для изомеров положения заместителей наблюдается обратная зависимость, и выбор стандартной обращенно-фазовой хроматографии будет давать удовлетворительные результаты.

Отмечено, что элюирование с непривитого силикагеля происходит преимущественно без размытия фронта хроматографического пика (рис. 1).

Помимо гидрофильной хроматографии, удерживание азотсодержащих гетероциклов было изучено в классическом обращенно-фазовом режиме при введении в систему кислотно-основных модификаторов. Необходимость введения модификаторов была обусловлена проявлением асимметрии и уширения пиков пятичленных гетероциклов при элюировании чистыми растворителями.

Диэтиламин, выступая в качестве основного модификатора подвижной фазы, вносит дополнительные ион-парные взаимодействия в гидрофобный механизм

Таблица 2. Факторы удерживания изученных азотсодержащих гетероциклов
Table 2. Retention factors of the studied nitrogen-containing heterocycles

№	Название	режим ОФ ВЭЖХ (ОДС)			Режим гидрофильной хроматографии (HILIC)
		k(ДЭА) $t_M = 4$ мин	k(HCOOH) $t_M = 3.6$	k(H ₂ O) $t_M = 4$	k (NH ₄ HCO ₂) $t_M = 3.2$
1	1Н-1,2,4-триазол	0.05	0.25	0.2	0.44
2	1Н-1,2,4-триазол-3,5-диамин	0.075	0.17	0.1	1.38
3	4-амино-4Н-1,2,4-триазол	0.1	0.17	0.1	1.13
4	3-метил-1Н-1,2,4-триазол	0.15	0.25	0.45	0.63
5	1Н-1,2,3-триазол	0.075	0.64	0.5	0.06
6	3-амино-1Н-1,2,4-триазол	0.05	0.17	0.175	0.75
7	1Н-пиразол	1.5	1.00	1.525	0.06
8	3-метил-1Н-пиразол	2.175	1.00	2.15	0.09
9	1-метил-3-амино-1Н-пиразол	0.9	0.31	0.9	0.41
10	5-этил-1Н-пиразол-3-амин	1.975	1.17	1.95	0.34
11	1Н-имидазол	0.5	0.14	0.125	1.31
12	2-метил-1Н-имидазол	0.75	0.22	0.15	3.16
13	1,2-диметил-1Н-имидазол	1.825	0.25	0.15	3.88
14	1-этил-1Н-имидазол	2.125	0.33	1.675	1.25
15	3-(2-метилимидазол-1-ил)пропан-1-амин	1.725	0.06	0.15	2.34
16	6-метил-1,3,5-триазин-2,4-диамин	0.625	0.22	0.625	1.22
17	пиридазин	0.675	0.61	0.625	0.47
18	пиримидин	0.825	0.97	0.825	0.34
19	пиразин	0.825	1.06	1.025	0.22

удерживания. Это незначительно снижает удерживание триазолов, являющихся слабыми основаниями, среди которых для 1Н-1,2,3-триазола влияние модификатора наиболее выражено. Удерживание имидазолов, наоборот, возрастает, сильнее всего – у 1,2-диметил-1Н-имидазола. Для шестичленных гетероциклов присутствие ДЭА не оказывает значительного влияния. Важно отметить, что использованный сорбент эндкемп-

ирован, соответственно, отсутствуют остаточные силанольные группы, которые ДЭА мог бы блокировать. Для рассматриваемых систем введение ДЭА не оказывает положительного влияния, а напротив, еще более ухудшает форму хроматографического пика (рис. 2).

Исходя из рис. 2 можно заметить, что присутствие ДЭА также приводит к появлению системного пика, вызванного собственным элюированием ДЭА и иониза-

Таблица 3. Сравнительная характеристика коэффициентов селективности α для некоторых систем

Table 3. Comparative characterization of selectivity coefficients α for some systems

№	Разделяемые сорбаты	α (H ₂ O, ОДС)	α (HCOOH, ОДС)	α (NH ₄ HCO ₂ , HILIC)
1	1H-1,2,4-триазол/1H-1,2,3-триазол	2.5	2.6	7.3
2	4-амино-4H-1,2,4-триазол/3-амино-1H-1,2,4-триазол	1.8	1	1.5
3	3-метил-1H-1,2,4-триазол/1H-1,2,3-триазол	1.1	2.6	10.5
4	1H-пиразол/1H-имидазол	12.2	7	21.8
5	3-метил-1H-пиразол/2-метил-1H-имидазол	14.3	4.5	35.1
6	1H-имидазол/2-метил-1H-имидазол	1.2	1.6	2.4
7	1,2-диметил-1H-имидазол/1-этил-1H-имидазол	11.2	1.32	3.1
8	6-метил-1,3,5-триазин-2,4-диамин/пиридазин	1	2.8	2.6
9	пиридазин/пиримидин	1.3	1.6	1.4
10	пиридазин/пиразин	1.6	1.7	2.1
11	пиримидин/пиразин	1.2	1	1.5

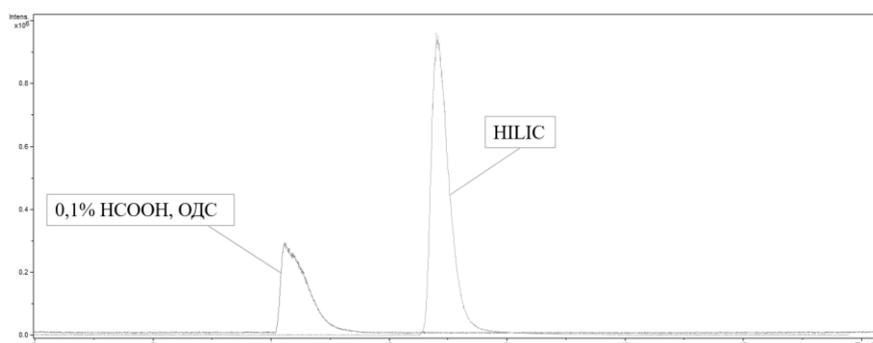


Рис. 1. Хроматограммы при МС-детектировании 4-амино-1H-1,2,4-триазола, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.1% HCOOH, и в режиме HILIC.

Хроматограммы записаны при $m/z = 85.05 \pm 0.05$ протонированного иона.

The MS chromatograms of 4-amino-1H-1,2,4-triazole eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.1% of HCOOH as well as in HILIC mode. The chromatograms were recorded at $m/z = 85.05 \pm 0.05$ of the protonated ions.

цией при 65-66% содержании ацетонитрила. Кроме того, ДЭА имеет тенденцию подавлять ионизацию пятичленных гетероциклов в режиме электрораспыления и

регистрации положительных ионов (рис. 3) вплоть до полного исчезновения сигнала анализируемого вещества (рис. 4), что

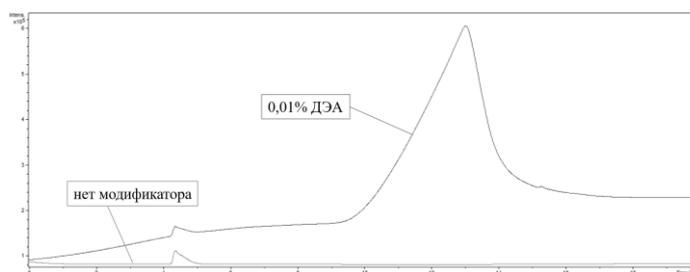


Рис. 2. Хроматограммы при спектрофотометрическом детектировании 4-амино-4Н-1,2,4-триазола, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.01% ДЭА, и при его отсутствии. Длина волны 210 нм.

Fig. 2. The spectrophotometric detection chromatograms of 4-amino-4H-1,2,4-triazole eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.01% of diethylamine solution and in its absence. The wavelength was 210 nm.

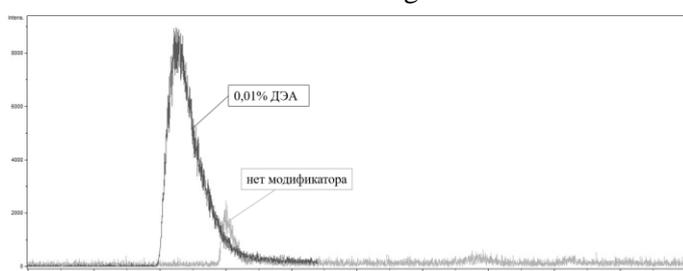


Рис. 3. Хроматограммы при МС-детектировании 1Н-имидазола, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.01% ДЭА, и при его отсутствии. Хроматограммы записаны при $m/z = 69.04 \pm 0.05$ протонированного иона.

Fig. 3. The MS chromatograms of 1H-imidazole eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.01% of diethylamine solution and in its absence. The chromatograms were recorded at $m/z = 69.04 \pm 0.05$ of the protonated ions.

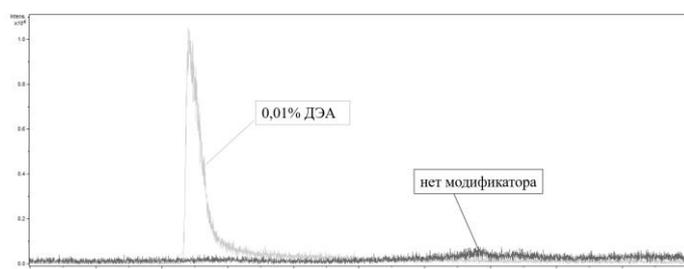


Рис. 4. Хроматограммы при МС-детектировании 1Н-1,2,4-триазола, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.01% ДЭА, и при его отсутствии. Хроматограммы записаны при $m/z = 70.04 \pm 0.05$ протонированного иона.

Fig. 4. The MS chromatograms of 1H-1,2,4-triazole eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.01% of diethylamine solution and in its absence. The chromatograms were recorded at $m/z = 70.04 \pm 0.05$ of the protonated ions.

может наблюдаться для молекул с молекулярной массой меньше, чем у ДЭА (73.14 Да). Подобный эффект ранее упоминался в литературе [26].

С другой стороны, введение 0.1% раствора муравьиной кислоты в подвижную фазу значительно повышает интенсивность ионизации (рис. 5) и улучшает форму хроматографического пика (рис. 6).

Имеются литературные данные, сообщающие о достижении оптимальных параметров удерживания для разделения шестичленных азотсодержащих гетероциклических гербицидов при использовании подвижной фазы с добавкой 0.1% НСООН [27]. Действительно, если вновь обратиться к таблице 3, то можно видеть

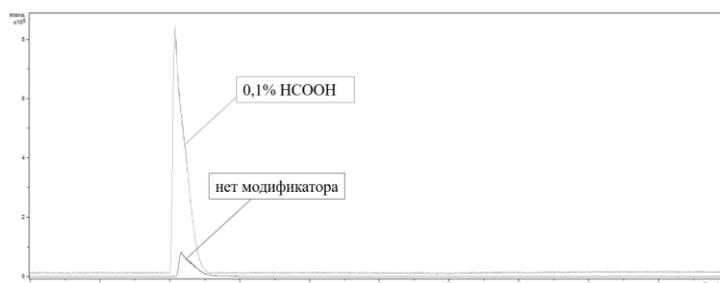


Рис. 5. Хроматограммы при МС-детектировании 1H-1,2,4-триазол-3,5-диамина, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.1% HCOOH, и при ее отсутствии. Хроматограммы записаны при $m/z = 100.06 \pm 0.05$ протонированного иона.

Fig. 5. The MS chromatograms of 1H-1,2,4-triazole-3,5-diamine eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.1% of HCOOH and in its absence. The chromatograms were recorded at $m/z = 100.06 \pm 0.05$ of the protonated ions.

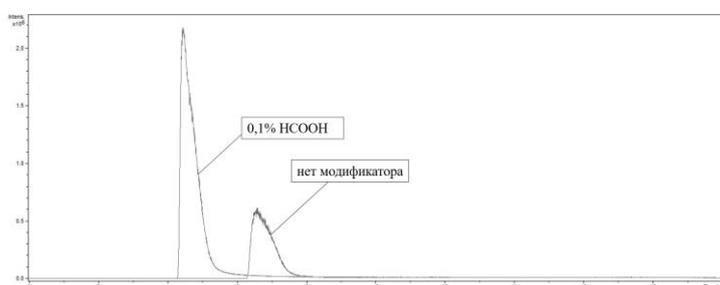


Рис. 6. Хроматограммы при МС-детектировании 6-метил-1,3,5-триазин-2,4-диамина, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.1% HCOOH, и при ее отсутствии. Хроматограммы записаны при $m/z = 126.07 \pm 0.05$ протонированного иона.

Fig. 6. The MS chromatograms of 6-methyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.1% of HCOOH and in its absence. The chromatograms were recorded at $m/z = 126.07 \pm 0.05$ of the protonated ions.

повышение селективности хроматографического разделения для неизомерных азинов. В остальных случаях введение муравьиной кислоты в подвижную фазу, как правило, ухудшает разделение изомерных гетероциклов. Соответственно, выбор в пользу муравьиной кислоты можно сделать, если основной целью является не повышение селективности разделения, а усиление интенсивность и улучшение формы получаемого хроматографического сигнала.

Таким образом, согласно полученным результатам, разделение пятичленных гетероциклов достигается при элюировании в режиме гидрофильной хроматографии, при этом удерживание на ОДС позволяет разделять изомерные диазины без использования модификаторов подвижной фазы.

Заключение

Изучено удерживание девятнадцати азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ-МС в режиме ионизации электрораспылением. Показано, что введение 0.1% водного раствора муравьиной кислоты в качестве кислотного модификатора улучшает ионизацию и интенсивность сигнала масс-спектрометра, однако не всегда позволяет добиться удовлетворительного разделения при элюировании с поверхности ОДС. Введение 0.01% раствора диэтиламина, наоборот, не дает выраженного улучшения в разделении по сравнению с подвижной фазой без модификаторов. Использование непривитого силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии позволяет



разделять изомерные пятичленные гетероциклы с получением узких симметричных пиков, однако не имеет преимущества перед ОДС при разделении диазинов.

Список литературы/References

1. Arora P., Arora V., Lamba H.S., Wadhwa D., Importance of Heterocyclic Chemistry, a Review, *IJPSR*, 2012; 3: 2947-2954.
2. Liao P., Yuan S., Xie W., Zhang W., Tong M., Wang K., Adsorption of nitrogen-heterocyclic compounds on bamboo charcoal, Kinetics, thermodynamics, and microwave regeneration, *J Colloid Interface Sci*, 2013; 390: 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.09.037>
3. Milyushkin A.L., Birin K.P., Matyushin D.D., Semeikin A.V., Iartsev S.D., Karnaeva A.E., Uleanov A.V., Buryak A.K., Isomeric derivatives of triazoles as new toxic decomposition products of 1,1-dimethylhydrazine, *Chemosphere*, 2019; 217: 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.155>
4. Sholokhova A.Y., Grinevich O.I., Matyushin D.D., Buryak A.K., Machine learning-assisted non-target analysis of a highly complex mixture of possible toxic unsymmetrical dimethylhydrazine transformation products with chromatography-mass spectrometry, *Chemosphere*, 2022; 307: 135764. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135764>
5. Ul'yanovskii N.V., Kosyakov D.S., Popov M.S., Shavrina I.S., Ivakhnov A.D., Kenessov B., Lebedev A.T., Rapid quantification and screening of nitrogen-containing rocket fuel transformation products by vortex assisted liquid-liquid microextraction and gas chromatography – high-resolution Orbitrap mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 2021; 171: 106821. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106821>
6. Fay L.B., Ali S., Gross G.A., Determination of heterocyclic aromatic amines in food products, Automation of the sample preparation method prior to HPLC and HPLC-MS quantification, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1997; 376: 29-35. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00022-5)
7. Frei R.W., Beall K., Cassidy R.M., Determination of Aromatic Nitrogen Heterocycles in Air Samples by High-Speed Liquid Chromatography, *Mikrochim Acta*, 1974; 62: 859-869. <https://doi.org/10.1007/BF01218306>
8. Saito K., Kobayashi K., Ohmiya S., Otomasu H., Murakoshi I., Analysis of lupine alkaloids in plants by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 1989; 462: 333-340. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)91359-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)91359-1)
9. Sawaya A.C.F., Abreu I.N., Andrezza N.L., Eberlin M.N., Mazzafera P., HPLC-ESI-MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*, *Molecules*, 2008; 13: 1518-1529. <https://doi.org/10.3390/molecules13071518>
10. Yogo K., Takemura C., Saito Y., Jinno K., An abnormal temperature dependence of alkylypyrazines' retention in reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Sciences*, 2011; 27: 1257-1260. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.1257>
11. Feng Y., Xu Y., Li W., Chen S., Su Z., Xi L., Li G., Improved enrichment and analysis of heterocyclic aromatic amines in thermally processed foods by magnetic solid phase extraction combined with HPLC-MS/MS, *Food Control*, 2022; 137: 108929. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108929>
12. Švábenský R., Oravec M., Šimek Z., Determination of polycyclic aromatic nitrogen heterocycles in soil using liquid

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.



- chromatography/tandem mass spectrometry, *Int J Environ Anal Chem*, 2009; 89: 167-181. <https://doi.org/10.1080/03067310802499423>
13. Kerru N., Gummidi L., Maddila S., Gangu K.K., Jonnalagadda, S.B., A Review on Recent Advances in Nitrogen-Containing Molecules and Their Biological Applications, *Molecules*, 2020; 25: 1909. <https://doi.org/10.3390/molecules25081909>
14. Polyakova Y.L., Row K.H., Retention of some five-membered heterocyclic compounds on a porous graphitized carbon, Hypercarb™, *Chromatographia*, 2007; 65: 59-63. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0119-0>
15. Karaseva I.N., Karasev M.O., Nechaeva O.N., Kurbatova S.V. Vliyanie prirody sorbenta na uderzhivanie proizvodnyh 1,2,4-triazola i 1,2,4-triazina v usloviyah obrashchenno-fazovoj vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii. *ZHurnal fizicheskoy himii*. 2019; 93: 128-136. <https://doi.org/10.1134/s0044453719010138> (In Russ.)
16. Karaseva I.N., Karasev M.O., Kurbatova S.V. Influence of the topology of molecules on the sorption of derivatives of 1,2,4-triazole and 1,2,4-triazine by nonpolar sorbents under conditions of liquid chromatography. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie Protsessy*, 2018; 18(6): 893-905. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/618> (In Russ.)
17. Jandera P., Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography, a review, *Anal Chim Acta*, 2011; 692: 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>
18. Nguyen H.P., Schug K.A., The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations, Fundamentals and applications, *J Sep Sci*, 2008; 31: 1465-1480. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700630>
19. Greco G., Letzel T., Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations, *J Chromatogr Sci*, 2013; 51: 684-693. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt015>
20. Guo Y., Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), *Analyst*, 2015; 140: 6452-6466. <https://doi.org/10.1039/C5AN00670H>
21. Buszewski, B., Noga, S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique, *Anal Bioanal Chem*, 2012; 402: 231-247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
22. Chen Q., Zielinski D., Nowak S.A., Fast and sensitive method for the determination of trace 1,2,4-triazole and 4-amino-1,2,4-triazole by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in antifungal drug substance, *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2018; 41: 770-779. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1485040>
23. Majer V.R. Prakticheskaya vysokoeffektivnaya zhidkostnaya hromatografiya. Moskva, Tekhnosfera, 2019. 408 p. (In Russ.)
24. Grinevich O.I., Buryak A.K., Theoretical Study of the Adsorption of Some Azoles on the Graphene Surface. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2024; 98(1): 205-210. <https://doi.org/10.1134/S0036024424010096>
25. Grinevich O.I., Volkov V.V., Buryak A.K., Diazines on graphene, adsorption, structural variances and electronic states, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2022; 24: 29712-29720. <https://doi.org/10.1039/d2cp05096j>
26. Peng L., Jayapalan S., Chankvetadze B., Farkas T., Reversed-phase chiral HPLC and LC/MS analysis with tris(chloromethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose and amylose as chiral stationary phases, *J Chromatogr A*, 2010; 1217: 6942-6955. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.075>
27. Amelin, V.G. Bol'shakov, D.S. Andoralov, A.M. Skrining i opredelenie pesticidov razlichnyh klassov v prirodnoj



vode bez probopodgotovki metodom ul'tra
VEZHKN-kvadrupol'-vremyaproletnoj
mass-spektrometrii vysokogo razresheniya.

ZHurnal analiticheskoy himii. 2018; 73(3):
214-223. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

О.И. Гриневич – аспирант, м.н.с. лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

А.Ю. Шолохова – с.н.с. лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

Д.Д. Матюшин – н.с. лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

O.I. Grinevich – Ph.D. student, researcher, laboratory of physicochemical principles of chromatography and chromatography – mass spectrometry; Institute of Physical chemistry and electrochemistry, Moscow, Russian Federation, email: oksigri-nevich@gmail.com, ORCID: 0000-0002-8242-5461

A.Yu. Sholokhova – researcher, laboratory of physicochemical principles of chromatography and chromatography – mass spectrometry; Institute of Physical chemistry and electrochemistry, Moscow, Russian Federation, email: shonastya@yandex.ru, ORCID: 0000-0003-4192-1677

D.D. Matyushin – researcher, laboratory of physicochemical principles of chromatography and chromatography – mass spectrometry; Institute of Physical chemistry and electrochemistry, Moscow, Russian Federation, email: dm.matiushin@mail.ru, ORCID: 0000-0003-0978-7666

Статья поступила в редакцию 27.01.2024; одобрена после рецензирования 15.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 27.01.2024; approved after reviewing 15.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.151.6:616.4

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12240

Активность глутатионредуктазы при нарушении функции печени и регуляция интермедиатами цикла Кребса каталитического действия фермента, выделенного с помощью хроматографических методов

**Александр Алексеевич Агарков¹✉, Сергей Сергеевич Попов²,
Татьяна Николаевна Попова¹**

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, agalalek@mail.ru✉

²Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

Аннотация. Целью настоящей работы явилось определение активности глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) в сыворотке крови больных с алкогольным гепатитом (АГ) и в сыворотке крови и печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом (ЭТГ), а также разработка схемы очистки фермента из печени экспериментальных животных с применением хроматографических методов. В эксперименте использовали сыворотку крови практически здоровых лиц с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови (контрольная группа пациентов), людей, которым был поставлен диагноз алкогольный гепатит (АГ), а также сыворотку и печень крыс контрольной группы и животных с ЭТГ. Патологическое состояние у экспериментальных животных моделировали путем перорального введения четыреххлористого углерода – органоспецифического токсина, обладающего гепатотропным эффектом, в виде 33% раствора в вазелиновом масле из расчета 64 мкл токсина на 100 г веса животного. Забой животных производили на 4 сутки после введения токсического агента. Контрольным животным вводили соответствующую аликвоту вазелинового масла. Активность ГР определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм. Общее количество белка определяли по методу Лоури. Для исследования регуляторных свойств фермента была проведена его очистка из печени крыс контрольной группы и животных с индуцированным токсическим гепатитом с помощью методов разделения белков сульфатом аммония, а также гель-фильтрации через сефадекс G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. В результате были получены ферментные препараты ГР, очищенные в 54.5 и 49.1 раза из печени крыс контрольной группы и животных с ЭТГ. Установлено, что в процессе ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой фермент из печени исследуемых групп животных десорбировался в виде одного пика при концентрации КСl 100 мМ. С использованием полученных ферментных препаратов выявлены различия в регуляции активности ГР под действием интермедиатов цикла Кребса, что, очевидно, связано с конформационными модификациями молекулы фермента в условиях оксидативного стресса, развивающегося при патологии.

Ключевые слова: глутатионредуктаза, токсический гепатит, алкогольный гепатит, окислительный стресс, изоцитрат, малат, 2-оксоглутарат.

Для цитирования: Агарков А.А., Попов С.С., Попова Т.Н. Активность глутатионредуктазы при нарушении функции печени и регуляция интермедиатами цикла Кребса каталитического действия фермента, выделенного с помощью хроматографических методов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 386-394. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12240>

Original article

The activity of glutathione reductase under impaired liver function and regulation by the Krebs cycle intermediates of the catalytic action of the enzyme isolated by chromatographic methods

Alexander A. Agarkov¹✉, Sergey S. Popov², Tatyana N. Popova¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia, agalalek@mail.ru✉

²Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko, Voronezh, Russia

© Агарков А. А., Попов С. С., Попова Т. Н., 2024



Abstract. The aim of the study was to determine the activity of glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) in the blood serum of patients with alcoholic hepatitis (AH) and in the blood serum and livers of rats with experimental toxic hepatitis (ETH), as well as to develop a scheme for the purification of the enzyme from the liver of experimental animals using chromatographic methods. In the experiment, we used the blood serum of apparently healthy individuals with normal indices of general and biochemical blood tests (control group of patients), people diagnosed with alcoholic hepatitis (AH), as well as the serum and livers of rats in the control group and rats with ETG. The pathological state in experimental animals was modelled by oral administration of carbon tetrachloride, an organ-specific toxin with hepatotropic effect, as a 33% solution in paraffin oil at the rate of 64 μl of toxin per 100 g of animal weight. The animals were slaughtered on the 4th day after administration of the toxic agent. The control animals were injected with the corresponding aliquot of paraffin oil. The activity of GR was determined spectrophotometrically using a spectrophotometer SF-46 at a wavelength of 340 nm. The total amount of protein was determined by the Lowry method. To study the regulatory properties of the enzyme, it was purified from the livers of the control rats and those with induced toxic hepatitis using the protein separation by ammonium sulphate, as well as gel filtration through Sephadex G-25 and ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. As a result, we obtained 54.5 and 49.1 times purified GR enzyme preparations from the livers of the control rats and animals with ETG. We determined that in the process of ion-exchange chromatography using a column with DEAE-cellulose, the enzyme from the livers of the studied groups of animals was desorbed as a single peak at a KCl concentration of 100 mM. Using the obtained enzyme preparations, we detected differences in the regulation of GR activity under the action of Krebs cycle intermediates. They are obviously associated with conformational modifications of the enzyme molecules under oxidative stress developing during pathology.

Keywords: glutathione reductase, toxic hepatitis, alcoholic hepatitis, oxidative stress, isocitrate, malate, 2-oxoglutarate

For citation: Agarkov A.A., Popov S.S., Popova T.N. The activity of glutathione reductase under impaired liver function and regulation by the Krebs cycle intermediates of the catalytic action of the enzyme isolated by chromatographic methods. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 386-394. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12240>

Введение

Известно, что основным органом, участвующим в биотрансформации различных ксенобиотиков является печень [1, 2]. Воздействие на организм токсинов, особенно в высоких концентрациях, может привести к ее метаболической дисфункции, как острого, так и хронического характера [3]. Так, установлено, что часто используемый промышленный растворитель CCl_4 может приводить к повреждению печени и, в этой связи, широко применяется для создания экспериментального токсического поражения данного органа [4, 5]. Токсическое действие этанола на гепатоциты и, как следствие, поражение их продуктами его метаболизма лежит в основе алкогольного гепатита (АГ) [6].

Известно, что важным звеном в механизме развития заболеваний печени различной этиологии является оксидативный стресс [7], а его признаки объективно отражают тяжесть поражения тканей и состояние защитных систем организма [8]. Вызванные окислительным стрессом

нарушения в гепатоцитах происходят под действием активных форм кислорода (АФК), генерируемых в реакциях митохондриального и микросомального окисления, а также в реакциях окисления токсических веществ [9, 10].

Глутатион является основным внутриклеточным антиоксидантом. В неблагоприятных условиях система глутатиона направлена на сохранение гомеостаза организма путем работы его ферментных систем, ориентированных на сохранение сбалансированного взаимоотношения между его отдельными фракциями – окисленная форма глутатиона (GSSG) быстро переходит в восстановленную (GSH) и осуществляет свою антиоксидантную функцию. Реакцию восстановления GSSG катализирует глутатионредуктаза (ГР) [11, 12].

Целью настоящей работы явилось определение активности ГР из печени и сыворотки крови крыс с экспериментальным токсическим гепатитом и в сыворотке крови людей с алкогольным гепатитом, а также исследование некоторых

регуляторных свойств фермента, выделенного из гепатоцитов крыс с патологией с применением хроматографических методов.

Экспериментальная часть

В исследование было включено 139 человек. Из них 65 практически здоровых лиц с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови составили контрольную группу, 74 пациентам был поставлен диагноз алкогольный гепатит (АГ) минимальной и умеренной степени активности, развивающийся вследствие хронического употребления алкоголя. Диагноз у пациентов был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени. Средняя продолжительность заболевания составляла 6.2 ± 0.4 месяца. В ходе клинического исследования использовали сыворотку крови больных, находящихся на лечении в стационаре. Кровь для исследования забиралась в пробирки типа «вакутейнер» в утреннее время, натощак, из локтевой вены. Исследования проводились в соответствии с требованиями биомедицинской этики согласно Женевской конвенции о правах человека (1997 г.) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.) на основании разрешения локального этического комитета, в связи с чем, у всех пациентов было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в клиническом исследовании.

Также, в качестве объекта исследования использовались белые лабораторные крысы-самцы массой 150-200 г. Животные содержались на стандартном режиме вивария. Все манипуляции, проводимые во время эксперимента, соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по от-

бору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (УК РФ ст. 245).

Эксперимент был проведен на животных, разделенных на две группы: 1-я группа – крысы, содержащиеся на стандартном режиме вивария; 2-я группа – крысы с экспериментальным токсическим гепатитом (ЭТГ).

Экспериментальный токсический гепатит у крыс моделировали путем перорального введения четыреххлористого углерода – органоспецифического токсина, обладающего гепатотропным эффектом, в виде 33% раствора в вазелиновом масле из расчета 64 мкл токсина на 100 г веса животного [13, 14]. Забой животных производили на 4 сутки после введения токсического агента. Контрольным животным вводили соответствующую аликвоту вазелинового масла.

Печень крысы извлекали под наркозом после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором и использовали для дальнейших исследований.

Активность фермента определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм. О скорости реакции судили по падению оптической плотности в результате окисления НАДФН. Измерение активности проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH=7.4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0.80 мМ глутатион окисленный, 0.16 мМ НАДФН. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при 25°C. Реакцию начинали внесением ферментного препарата. Содержание белка определяли по методу Лоури и соавт.

Очистка ГР из печени животных исследуемых групп включала несколько стадий:

1. Гомогенат печени получали с помощью растирания ткани в фарфоровой ступке в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения, приготовленной на основе 0.1 мМ трис-НСI-буфера (pH=7.6),



содержащего 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Затем гомогенат фильтровали и центрифугировали при 7000 g в течение 12 мин. Полученную белковую субстанцию использовали для фракционирования белков сульфатом аммония.

Определение границ высаливания ГР из белкового раствора проводили путём ступенчатого повышения градиента концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в гомогенате печени. Для этого кристаллический сульфат аммония добавляли к гомогенату в количестве, соответствующем нижней границе насыщения (40%). Смесь центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин. Осадок отбрасывали, а к надосадочной жидкости добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве, соответствующем верхнему пределу насыщения (70%). После центрифугирования при 15000 g в течение 15 мин получали осадок, содержащий ГР. Полученный осадок ресуспендировали в 4 см³ среды выделения.

2. Обессоливание на сефадексе G-25. Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (1.5×20 см) [15]. В качестве элюирующей среды использовали 0.01 М трис-НСl-буфер (рН=7.6), содержащий 0.1 ммоль/дм³ ЭДТА, 1%β-меркаптоэтанол. Скорость элюции составляла 20-25 см³/час, её регулирование осуществлялось путем изменения гидростатического давления. Каждую фракцию объемом 2-3 см³ анализировали на присутствие ферментативной активности. Эффективность обессоливания раствора фермента проверяли качественной реакцией с реактивом Несслера, образующим с ионами аммония характерный красно-бурый осадок [16]. Обессоленные фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

3. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Обессоленный раствор фермента наносили на колонку с

ДЭАЭ-целлюлозой (1.2×13 см), уравновешенную элюирующей средой, применяемой в ходе очистки на предыдущей стадии. Для очистки ГР использовали ступенчатый градиент концентраций КСl в элюирующем буфере. Элюирующая среда содержала вышеназванные ингредиенты. В ходе ионообменной хроматографии фермент десорбировался с колонки в ступенчатом градиенте КСl 50-100 ммоль/дм³. Скорость элюции – 30-40 см³/ч. Каждую фракцию объемом 1.5-2.0 см³ анализировали на присутствие ферментативной активности ГР. Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C.

Опыты проводили в 3-4 кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух повторностях. Данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов [17].

Обсуждение результатов

В ходе проведенных исследований установлено, что у пациентов с АГ происходило снижение активности ГР, выраженной в Е/см³ сыворотки крови в Е/мг белка в 1.2 и 1.4 раза относительно контрольной группы (рис. 1). Известно, что ацетальдегид, в условиях хронической алкогольной интоксикации, накапливаясь внутри клеток печени, приводит к усилению пероксидного окисления липидов, продукты которого вызывают нарушение образования НАДФН [18]. Вероятно, в условиях сниженного содержания указанного восстановительного компонента, необходимого для оптимального протекания ГР-реакции, скорость последней снижается.

В ходе работы было установлено, что активность ГР в сыворотке крови крыс с ЭТГ, выраженная в Е/см³, и представленная в Е/мг белка, возрастала в 1.4 и 1.9 раза (рис. 1). Подобная тенденция была характерна и в отношении активности ГР

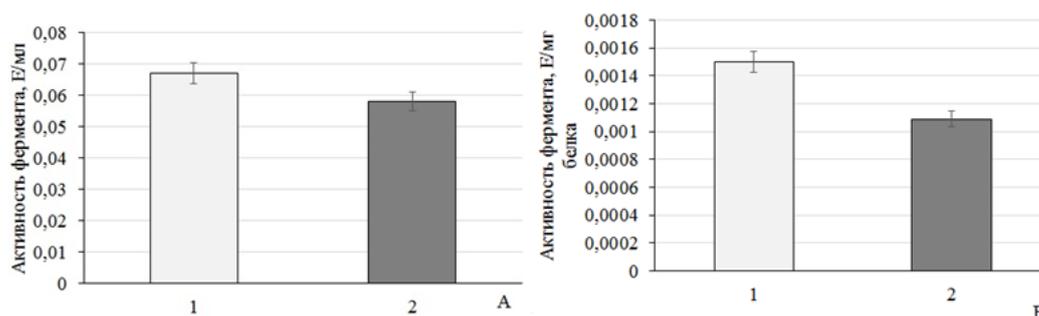


Рис. 1. Активность глутатионредуктазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (А), и представленная в виде Е/мг белка (Б), у людей контрольной группы (1), больных алкогольным гепатитом (2).

Fig. 1. Glutathione reductase activity, expressed in U/ml of serum (A), and presented as U/mg of protein (B), in people in the control group (1), patients with alcoholic hepatitis (2).

в печени лабораторных животных, где активность фермента, выраженная в Е/г сырой массы ткани и Е/мг белка увеличивалась в 1.9 и 1.5 раза относительно контроля (рис. 1). Очевидно, наблюдаемые изменения являлись адаптационной реакцией организма, направленной на восстановление глутатиона, используемого в реакциях детоксикации АФК, чрезмерно генерируемых при патологии.

Как известно, ответ на развитие стрессового воздействия, включая нарушения оксидативного статуса, имеют стадии компенсации и дезадаптации [19]. По всей видимости, на фоне длительно протекающего хронического поражения печени у пациентов с алкогольным гепатитом происходила декомпенсация компонентов антиоксидантной системы, что отражалось в падении активности ГР. Что касается экспериментального моделирования токсического гепатита, то, очевидно, что в течение короткого периода индуцирования патологического состояния имела место компенсаторная ответная реакция, сопровождающаяся усилением синтеза глутатиона в ходе ГР-реакции.

Для исследования регуляторных свойств ГР в норме и при патологии была осуществлена очистка фермента из печени крыс контрольной группы и животных с патологией. С помощью используемых методов очистки, были получены ферментные препараты ГР с удельной ак-

тивностью 0.60 и 1.12 Е/мг белка из печени крыс контрольной группы и животных с ЭТГ соответственно (табл. 1).

В ходе работы было установлено, что в процессе ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой фермент из печени исследуемых групп животных десорбировался в виде одного пика при концентрации КСl 100 мМ (рис. 2). После нанесения ферментного препарата на колонку наслаивали 20 мл среды элюции (0.1 мМ трис-НСl-буфер (рН 7.6), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол), а затем 20 см³ 50 мМ раствора КСl для десорбции сопутствующих белков. Таким способом удалось повысить степень очистки ГР из печени крыс контрольной группы в 30.1 раза и животных с ЭТГ – 22.3 раза.

Считается, что образование восстановительных эквивалентов для функционирования глутатионовой антиоксидантной системы в условиях интенсификации СО наряду с ферментами пентозофосфатного пути могут осуществлять НАДФ-зависимые изоцитратдегидрогеназа и малатдегидрогеназа [20]. В этой связи с целью выявления возможных путей координации функционирования ГР и НАДФН-генерирующих ферментов было проведено исследование влияния субстратов и продуктов данных реакций на активность ГР в норме и в условиях патологии.

Таблица 1. Очистка глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы и животных с экспериментальным токсическим гепатитом

Table 1. Purification of glutathione reductase from the livers of the control rats and animals with experimental toxic hepatitis

Стадия очистки	Условия эксперимента	Количество белка, мг	Общая активность, Е/г сырой массы	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	норма	2.67±0.11	243.00±9.66	0.011±0.0004	100	1
	ЭТГ	6.40±0.29	276.00±11.98	0.023±0.0084	100	1
Фракционирование сульфатом аммония	норма	2.44±0.09	198.00±9.85	0.13±0.0006	91	1.2
	ЭТГ	6.10±0.27	203.00±10.18	0.037±0.0018	95	1.6
Обессоливание на сефадексе G-25	норма	2.29±0.08	115.00±5.77	0.020±0.0006	86	1.8
	ЭТГ	5.44±0.28	109.00±5.48	0.050±0.0028	85	2.2
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	1.21±0.04	1.98±0.08	0.600±0.0271	45	54.5
	ЭТГ	1.85±0.11	1.65±0.06	1.120±0.0514	29	49.1

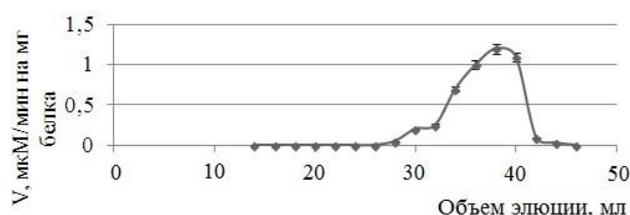


Рис. 2. Элюция глутатионредуктазы из печени крыс исследуемых групп животных в ходе хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе

Fig. 2. Elution of glutathione reductase from the livers of the studied groups of rats during the chromatography using DEAE-cellulose

Исследование влияния изоцитрата на активность ГР показало, что максимальный активирующий эффект имеет место при 0.30 мМ концентрации данного метаболита как для фермента из печени крыс контрольной группы, так и животных, подвергнутых токсическому гепатиту (рис. 3А). При дальнейшем повышении концентрации изоцитрата имеет место снижение активирующего эффекта для ГР из печени обеих групп животных. Ингибирование фермента наблюдается при концентрации изоцитрата свыше 0.80 и 0.55 мМ в условиях нормы и при патологии соответственно. Степень ингибирования выше для фермента из печени крыс контрольной группы.

По-видимому, стимуляция активности ГР субстратом ИДГ-реакции могла бы способствовать повышению активности фермента в патологическом состоянии. В этой связи интересно отметить, что удельная активность НАДФ-ИДГ возрастает при токсическом гепатите в 1.4 раза [21].

При исследовании влияния малата (рис. 3Б) и 2-оксоглутарата (рис. 3В) на активность ГР из печени крыс в норме и при токсическом гепатите было установлено, что при концентрации интермедиа-тов до 0.1 мМ происходит снижение ГР-активности. Но при дальнейшем повышении концентрации метаболитов скорость протекания ферментативной реакции возрастает, и при 0.3 мМ концентрации

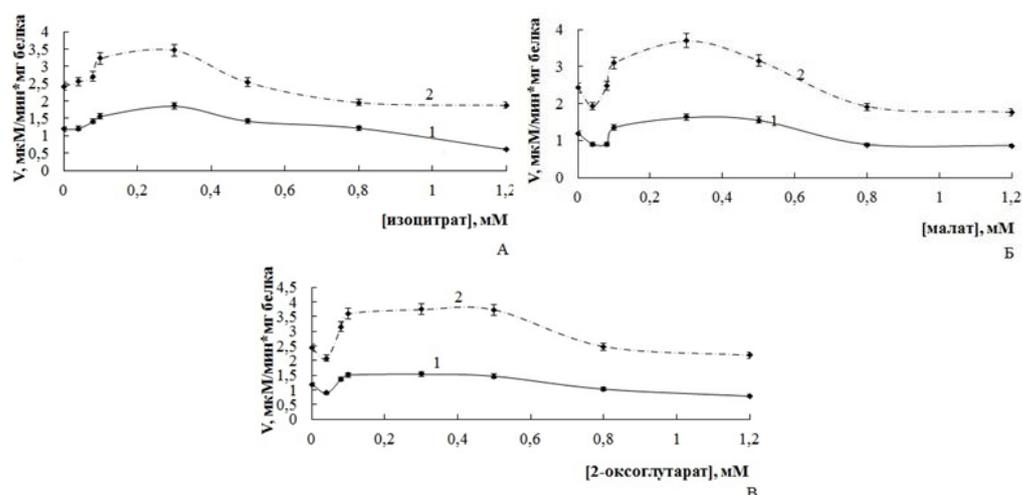


Рис. 3 Влияние изоцитрата (А), малата (Б) и 2-оксоглутарата (В) на активность глутатионредуктазы в норме (1) и при экспериментальном токсическом гепатите (2)

Fig. 3 Effect of isocitrate (A), malate (B), and 2-oxoglutarate (C) on the activity of glutathione reductase in the control group (1) and in experimental toxic hepatitis (2)

наблюдается максимальный активирующий эффект. При концентрации метаболитов свыше 0.5 мМ активность фермента вновь снижается.

Известно, что ответ на разные стимулы может развиваться как на уровне целого организма, так и в различных его системах. Молекулярные механизмы на клеточном уровне могут затрагивать формирование адаптивного ответа в том числе и через модификацию белков и их функций [22].

Характер клеточного ответа при этом будет зависеть от продолжительности и интенсивности воздействия неблагоприятных факторов. При умеренном воздействии формируется неспецифический ответ, повышающий адаптацию организма к новым условиям. При воздействии высокой интенсивности, например, при глубокой гипоксии наступает состояние дезадаптации, в том числе и за счет прямого повреждающего действия АФК на белковые молекулы [23].

Известно, что одним из важнейших следствий инициации редокс-сигнализации и АФК-опосредованной передачи сигнала является активация ядерных транскрипционных факторов, активируе-

мых реактивными молекулами кислорода. Среди известных к настоящему времени белков, которые синтезируются в ответ на редоксигнал от адаптирующего фактора, наибольшее значение имеет, прежде всего, ряд неспецифических молекул, в том числе ферменты антиоксидантной защиты [24]. В этой связи не исключена возможность изменения активности исследуемого фермента вследствие ускорения скорости синтеза фермента *de novo* при развитии патологического состояния печени у крыс, которое сопряжено с развитием оксидативного стресса.

Также существуют данные об участии АФК в регуляции редокс-статуса клетки и окислительных модификаций белков. Регуляция редокс-сигнализации может осуществляться как через общий уровень глутатиона (GSH) в клетке, так и через соотношение GSH/GSSG [25]. Вероятно, взаимодействие реактивных метаболитов кислорода с молекулой ГР могло приводить к конформационным перестройкам последней, имеющим значение для функционирования глутатионовой системы в условиях оксидативного стресса.

Заключение

Таким образом, обнаружены изменения активности ГР в сыворотке крови



больных с АГ, а также в печени и сыворотке крови крыс с ЭТГ по сравнению с нормой. С использованием ионообменной хроматографии, были получены препараты ГР из печени контрольных крыс и животных с патологией. со степенью очистки 54.5 и 49.1 соответственно. С использованием полученных препаратов исследуемого фермента, были обнаружены особенности в регуляции активности ГР под действием интермедиатов цикла Кребса в норме и в условиях окислительного стресса, возникающего на фоне ЭТГ. Вероятно, это могло быть свя-

зано с конформационными модификациями молекулы фермента, что, по-видимому, имеет значение для функционирования глутатионовой системы в условиях окислительного стресса, развивающегося при патологии.

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. Rusyn I., Arzuaga X., Cattley R.C., Corton J.Ch., Ferguson S.S., Godoy P., Guyton K.Z., Kaplowitz N., Khetani S.R., Roberts R., Roth R.A., Smith M.T., Key Characteristics of Human Hepatotoxicants as a Basis for Identification and Characterization of the Causes of Liver Toxicity, *Hepatology*, 2021; 74(6): 3486-3496. <https://doi.org/10.1002/hep.31999>
2. You M., Arteel G. E., Effect of ethanol on lipid metabolism, *Hepatology*, 2019; 70: 237-248. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.037>
3. Sun H., Chen L., Zhou W., Hu L. Liang Li 1, Tu Q., Chang Y., Liu Q., Sun X., Wu M., Wang H., The protective role of hydrogen-rich saline in experimental liver injury in mice, *Journal of Hepatology*, 2011; 54 (3): 471-480. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.011>.
4. Agarkov A.A. Diss. kand. biol. nauk. Voronezh, 2009, 222 p. (In Russ.)
5. Iskusnykh I.Y., Kryl'skii E.D., Brazhnikova D.A., Popova T.N., Shikhaliev K.S., Shulgin K.K., Matasova L.V., Popov S.S., Zhaglin D.A., Zakharova A.A., Popova N.R., Fattakhov N., Novel Antioxidant, Deethylated Ethoxyquin, Protects against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Apoptosis, *Antioxidants*, 2021; 10(1): 122. <https://doi.org/10.3390/antiox10010122>
6. Chen M., Zhong W., Xu W., Alcohol and the mechanisms of liver disease, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2023; 38: 1233-1240. <https://doi.org/10.1111/jgh>
7. Jakupova T.G., Karimov D.O., Bakirov A.B. Izmenenie jekspressii genov oksidativnogo stressa pri toksicheskikh gepatitah raznoj jetiologii i ih korrekciya, *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*, 2023; 216(8): 120-126. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-216-8-120-126> (In Russ.)
8. Babior B.M., Phagocytes and oxidative stress, *Am. J. Med.*, 2000; 109 (1): 33-44.
9. Dudnik L.B., Viksna L.M., Majore A.Ja., Peroksidnoe okislenie lipidov i ego svjaz' s izmeneniem sostava i antiokislitel'nyh svojstv lipidov pri komatogennyh formah ostrogo virusnogo gepatita V, *Voprosy medicinskoj himii*, 2000; 6: 597-609. (In Russ.)
10. Kryl'skii E.D., Sinitsyna D.A., Popova T.N., Shikhaliev K.S., Medvedeva S.M., Matasova L.V., Mittova V.O., The new antioxidant 1-benzoyl-6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline has a protective effect against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats, *The Journal of Biomedical Research*, 2022; 36(6): 423-434. <https://doi.org/10.7555/JBR.36.20220098>
11. Blinova T.V., Strahova L.A., Troshin V.V., Kolesov S.A., Umnjagina I.A., Ivanova Ju.V., Glutation kak prognosticheskij faktor riska narushenija zdorov'ja rabotajushhih lic, *Analiz riska zdorov'ju*, 2023; 2: 140-148. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2023.2.13> (In Russ.)
12. Kryl'skii, E.D.; Kravtsova, S.E.; Popova, T.N.; Matasova, L.V.; Shikhaliev, K.S.; Medvedeva, S.M., 6-Hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline Demonstrates Anti-Inflammatory Properties and Reduces Oxidative Stress in Acetaminophen-Induced Liver Injury in Rats, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2023; 45: 8321-8336. <https://doi.org/10.3390/cimb45100525>



13. Fedorova N.Ju. Avtoref. dis kand. biol. nauk. Voronezh, 1999, 24 p. (In Russ.)
14. Popova T.N., Shul'gin K.K., Shihaliev H.S., Kryl'skij E.D., Matasova L.V., Medvedeva S.M., Popov S.S., Verevkin A.N. Zajavka na patent. № 2017136371. 2019. (In Russ.)
15. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaja G.V., Drozdova N.V. Pigmenty pishhevyykh proizvodstv (melanoidy). Moskva, DeLi print., 2008, 246 p. (In Russ.)
16. Kramarenko V.F. Toksikologicheskaja himija. Moskva, Kniga po Trebovaniju, 2013, 445 p. (In Russ.)
17. Glants S. Mediko-biologicheskaja statistika. Moskva, Praktika, 1998, 459 p. (In Russ.)
18. Lazebnik L. B., Golovanova E. V., Tarasova L. V., Krivosheev A. B., Sas E. I., Eremina E. Ju., Truhan D. I., Hlynova O. V., Cyganova Ju. V., Alkogol'naja bolezn' pecheni (ABP) u vzroslykh, *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*, 2020; 174(2): 4-28. (In Russ.)
19. Voronina T.A., Rol' oksidativnogo stressa i antioksidantov pri dezadaptacii razlichnogo geneza, *Farmacija i farmakologija*, 2015; 3(5): 8-17. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2015-3-5s> (In Russ.)
20. Agarkov A.A., Popova T.N., Semehina A.V., Kataliticheskie svoystva glutathionreduktazy iz pecheni krysy v norme i pri toksicheskom gepatite, *Biomeditsinskaja himija*, 2009; 55(2): 169-176. (In Russ.)
21. Pashkov A.N., Popov S.S., Semehina A.V., Rahmanova T.I. Sostojanie sistemy glutathiona i aktivnost' nekotorykh NADPH-generirujushchih fermentov v pecheni krysy pri dejstvii melatonina v norme i pri toksicheskom gepatite, *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*, 2005; 139(5): 520-524. (In Russ.)
22. Jur'eva Je.A., Novikova N.N., Dlin V.V., Vozdvizhenskaja E.S., Molekuljarnyj stress i hronicheskie narushenija obmena veshhestv, *Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii*, 2020; 65(5): 12-22. (In Russ.)
23. Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova E.V., Rol' aktivnykh form kisloroda v fiziologii i patologii kletki i ih farmakologicheskaja reguljacija, *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii*, 2014; 12: 13-21. (In Russ.)
24. Luk'janova L.D., Sovremennye problemy adaptacii k gipoksii. Signal'nye mehanizmy i ih rol' v sistemnoj reguljácii, *Pat. fiziol. i jeksperim. Terapija*, 2011; 1: 3-19. (In Russ.)
25. Sazontova T.G., Arhipenko Ju.V., Rol' svobodnoradikal'nykh processov i redoks-signalizacii v adaptacii organizma k izmeneniju urovnja kisloroda, *Ros. fiziol. zhurn. im. I.I. Sechenova*, 2005; 91(6): 636-655. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

А.А. Агарков – доцент кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

С.С. Попов – Заведующий кафедрой организации фармацевтического дела, клинической фармации и фармакогнозии, д.м.н., Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

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

A.A. Alexander – docent, department of medical biochemistry, molecular and cell biology, Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russia, orcid.org/0000-0001-5774-7971, e-mail: agalalek@mail.ru

S.S. Popov – grand Ph.D (medicine, MD), Head of the Department of Organization of Pharmaceutical Business, Clinical Pharmacy and Pharmacognosy, N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, orcid.org/0000-0002-4438-9201, e-mail: popovendo@mail.ru

T.N. Popova – Dean of the Faculty of Biomedical Sciences, grand Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russia, orcid.org/0000-0002-9660-3054, e-mail: popova@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 05.03.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 05.03.2024; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.151

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12241

Определение молекулярной массы нативных молекул изоформ γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы, полученных из проростков кукурузы (*Zea mays* L.), методом гель-хроматографии

Галина Борисовна Анохина, Екатерина Валерьевна Плотникова,
Александр Трофимович Епринцев[✉]

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru[✉]

Аннотация. Известно, что при недостатке кислорода нарушается функционирование цикла трикарбоновых кислот, в результате чего происходит активация альтернативного пути – ГАМК-шунта, который обеспечивает поддержание функционирования цикла лимонной кислоты за счёт поставки янтарной кислоты. Ключевым этапом данного обходного пути является реакция, которую катализирует сукцинатсемиальдегиддегидрогеназа (ССАДГ, КФ 1.1.1.16). При недостатке кислорода ССАДГ перестает эффективно функционировать. Это приводит к накоплению полуальдегида янтарной кислоты в матриксе митохондрий, высокий уровень которого неблагоприятно действует на метаболизм растительной клетки. γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа (ГБДГ, КФ 1.1.1.61) – энзим, относящийся к классу оксидоредуктаз, который превращает γ -гидроксibuтират в полуальдегид янтарной кислоты, участвуя в процессе его детоксикации, что имеет важное значение в поддержании метаболизма растений при дефиците кислорода.

На сегодняшний день, к сожалению, данные о биохимических и кинетических особенностях γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы отсутствуют. В связи с этим в нашей лаборатории был разработан метод очистки ГБДГ из зеленых листьев кукурузы, который позволяет изучить физико-химические свойства данного энзима.

В ходе исследования проводилась пятистадийная очистка γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы из 7-дневных проростков *Zea mays* L. Гомогенизированный растительный материал с экстрагированными белками, подвергали двухстадийному фракционированию сульфатом аммония. Каталитическая активность определялась спектрофотометрически при $\lambda=340$ нм по количеству восстановленного НАД⁺. Для удаления солей аммония осуществляли гель-фильтрацию на Sephadex G-25. Разделение белков по заряду осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel. Энзим десорбировали линейным градиентом хлорида натрия (100-300 мМ). Использование гель-хроматографии через Sephadex G-200 позволило определить молекулярную массу очищенных изоформ фермента. Гомогенность ферментных препаратов подтверждена проведенным электрофорезом в полиакриламидном геле с универсальным окрашиванием AgNO₃. Принадлежность полученных белковых препаратов к γ -гидроксibuтиратдегидрогеназе была определена с помощью тетразолиевого метода.

В результате были получены гомогенные препараты двух изоформ фермента (ГБДГ1 и ГБДГ2). Первая изоформа γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы очищена в 185.7 раза с выходом 10% и имела удельную активность 343.6 Е/мг белка. Степень очистки второй изоформы составила 209 раз, выход 7.74%. Удельная активность полученного препарата – 386.7 Е/мг белка.

Использование гель-хроматографии на Sephadex G-200 позволило определить молекулярную массу нативных молекул гидроксibuтиратдегидрогеназы. Установлено, что в семидневных проростках кукурузы исследуемый фермент представлен в низкомолекулярной и высокомолекулярной формах: для ГБДГ1 значение M_r составляло ~60.3 кДа, в то время как для ГБДГ2 молекулярная масса энзима равнялась 286 кДа.

Ключевые слова: γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа, кукуруза, очистка, молекулярная масса, гель-хроматография.

Благодарности: работа выполнена при финансовой 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., Плотникова Е.В., Епринцев А.Т. Определение молекулярной массы нативных молекул изоформ γ -гидроксибутиратдегидрогеназы, полученных из проростков кукурузы (*Zea mays* L.), методом гель-хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24, № 3. С. 395-402. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12241>

Original article

Determination of the molecular weight of native molecules of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase isoforms obtained from maize (*Zea mays* L.) seedlings by gel chromatography

Galina B. Anokhina, Ekaterina V. Plotnikova, Alexander T. Eprintsev[✉]

Voronezh State University, Voronezh, Russia, bc366@bio.vsu.ru[✉]

Abstract. It is known that under oxygen deficiency the functioning of the tricarboxylic acid cycle is impaired, resulting in the activation of an alternative pathway, the GABA shunt. It maintains the functioning of the citric acid cycle by providing succinic acid. The key phase of this bypass is a reaction catalysed by succinate semi-aldehyde dehydrogenase (SSADH, EC 1.1.1.16). Under oxygen deficiency, SSADH ceases to function efficiently. This leads to the accumulation of succinic acid semialdehyde in the mitochondrial matrix and its high level adversely affects the plant cell metabolism. γ -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH, EC 1.1.1.61) is an enzyme belonging to the group of oxidoreductases. It transforms γ -hydroxybutyrate into succinic acid semialdehyde, participating in the process of its detoxification, which is important in the maintenance of plant metabolism under oxygen deficiency.

To date, unfortunately, there are no data on the biochemical and kinetic features of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase. In this regard, our laboratory developed a method for purification of HBDH from green maize leaves, which makes it possible to study the physicochemical properties of this enzyme.

During the study, we obtained γ -hydroxybutyrate dehydrogenase from 7-day-old seedlings of *Zea mays* L. by a five-stage purification. Homogenised plant material with extracted proteins was subjected to two-stage ammonium sulphate fractionation. The catalytic activity was determined spectrophotometrically at $\lambda=340$ nm by the amount of reduced NAD^+ . To remove ammonium salts, we used gel filtration through Sephadex G-25. Proteins were separated according to their charge by DEAE-Sephacel ion exchange chromatography. The enzyme was desorbed using a linear sodium chloride gradient (100-300 mM). The use of gel chromatography through Sephadex G-200 made it possible to determine the molecular mass of the purified enzyme isoforms. The homogeneity of enzyme preparations was confirmed by electrophoresis in polyacrylamide gel with universal AgNO_3 staining. We used the tetrazolium method to confirm that the obtained protein preparations were γ -hydroxybutyrate dehydrogenase.

As a result, homogeneous preparations of two isoforms of the enzyme (HBDH1 and HBDH2) were obtained. The first isoform of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase was 185.7 times purified with a yield of 10% and had a specific activity of 343.6 U/mg of protein. The purification rate of the second isoform was 209 times with a yield of 7.74%. The specific activity of the obtained preparation was 386.7 U/mg of protein.

Using gel chromatography through Sephadex G-200, we determined the molecular mass of native molecules of hydroxybutyrate dehydrogenase. We found that in 7-day-old maize seedlings the investigated enzyme was presented in low-molecular and high-molecular forms: for HBDH1 the M_r value was ~ 60.3 kDa, while for HBDH2 the molecular mass of the enzyme was 286 kDa.

Keywords: γ -hydroxybutyrate dehydrogenase, maize, purification, molecular weight, gel chromatography.

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

For citation: Anokhina G.B., Plotnikova E.V., Eprintsev A.T. Determination of the molecular weight of native molecules of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase isoforms obtained from maize (*Zea mays* L.) seedlings by gel chromatography. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 395-402. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12241>

Введение

Шунт γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-шунт) – это биохимический путь,

который растительная клетка использует не только для катаболизма γ -аминомасляной кислоты, но также для обхода



двух реакций ЦТК в случае невозможности их протекания как в виду специфических клеточных сигналов в ответ на действие различных внешних факторов, так и в случае инактивации одного или нескольких ферментов. ГАМК является важным метаболитом, который участвует в регуляции многих биологических процессов, таких как адаптация к абиотическим стрессам, фотосинтез, рост и развитие. ГАМК-шунт может быть активирован при стрессе, таком как засоление или дефицит кислорода, что является адаптивным механизмом растительных организмов к изменившимся условиям внешней среды [1].

Янтарная полуальдегиддегидрогеназа (ССАДГ, 1.2.2.16) – важный фермент, принимающий участие в функционировании шунтирующего пути ЦТК. Известно, что при длительном недостатке кислорода этот фермент либо полностью инактивируется, либо функционирует с малой эффективностью, что вызывает ряд метаболических перестроек и накоплению токсичного для клетки полуальдегида янтарной кислоты [2].

Механизм детоксикации полуальдегида янтарной кислоты (ССА), который оказывает ряд негативных эффектов на процессы клеточного гомеостаза, эволюционно сформировался в виде дополнительного пути, который в митохондриях обеспечивается, главным образом, каталитической активностью НАД⁺-зависимой γ -гидроксибутиратдегидрогеназы (ГБДГ, КФ 1.1.1.61). Этот энзим катализирует превращение γ -гидроксимасляной кислоты (γ -гидроксибутирата, ГОМК) в полуальдегид янтарной кислоты (рис. 1) [2].

Дефицит кислорода в растительных клетках вызывает увеличение концентрации ГОМК с 10 до 155 нмоль г⁻¹ сырой массы в ростках сои и с 273 до 739 нмоль г⁻¹ сухой массы в листьях зеленого чая [3]. Более того, концентрации ГОМК и ГАМК увеличиваются в растениях *Arabidopsis* в условиях воздействия различных стрессовых факторов, что должно

увеличивать клеточное соотношение НАДН/НАД⁺ и уменьшать энергетический заряд аденилата, тем самым ингибируя активность ССАДГ, препятствуя образованию полуальдегида янтарной кислоты [4]. Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что растения *A. thaliana* с мутацией гена ССАДГ, выращенные в условиях воздействия сильного ультрафиолетового излучения, демонстрировали в 5 раз более высокий уровень γ -гидроксимасляной кислоты и существенно более высокие уровни активных форм кислорода [5]. Каплан с соавт. показали, что колебания уровня γ -гидроксибутирата у растений *A. thaliana*, устойчивых к действию низких температур сопряжены с увеличением и падением уровня ГАМК [6]. В совокупности эти данные указывают на то, что накопление ГОМК в растениях, как и ГАМК, является общей реакцией на абиотический стресс [4].

В связи с тем, что ГАМК-шунт участвует в предотвращении накопления АФК, что, вероятно связано с предоставлением восстановительных эквивалентов для поддержания пулов антиоксидантов и детоксикации полуальдегида янтарной кислоты [7]. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что активность ГБДГ и ССАДГ в растениях регулируется взаимодополняющим образом с помощью окислительно-восстановительного баланса, и ГОМК выступает в качестве регулятора толерантности растительного организма к окислительному стрессу. К сожалению, очень мало данных, посвященных структурным и биохимическим особенностям функционирования ГБДГ в клетках животных, и еще меньше известно об особенностях данного фермента в растительных организмах.

В связи с этим, целью работы являлась очистка фермента γ -гидроксибутиратдегидрогеназы из семидневных проростков *Zea mays L.* и определение молекулярной массы нативных молекул изоформ ГБДГ

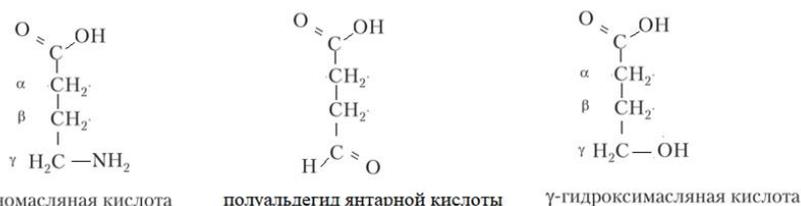


Рис. 1. Структурные формулы γ -аминомасляной кислоты, полуальдегида янтарной кислоты и γ -гидроксимасляной кислоты

Fig. 1. Structural formulae of γ -aminobutyric acid, succinic acid semialdehyde, and γ -hydroxybutyric acid

с помощью гель-хроматографии через Sephadex G-200.

Экспериментальная часть

Очистка γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы осуществлялась из семидневных проростков кукурузы (*Zea mays L.*) сорта Воронежская-76, выращенные гидропонно без добавления питательных растворов при десятичасовом световом дне в климатической камере «LabTech» (Корея) при интенсивности света $90 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и температуре окружающей среды 25°C .

Каталитическая активность γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы в проростках *Zea mays L.* определяли при 25°C (спектрофотометр Evolution 260 Bio, Thermo Fisher Scientific, США) по скорости восстановления НАД^+ до НАДН при длине волны 340 нм в реакционной среде, содержащей: 16 мМ натриевой соли оксимасляной кислоты (Sigma Aldrich, США), 1 мМ НАД^+ , 100 мМ Tris-HCl буфер (pH 9.0). Запуск реакции осуществляли путём добавления ферментного препарата. В качестве контроля использовали среду спектрофотометрирования без добавления энзима [9].

Очистку ГБДГ проводили в несколько этапов при $+4^\circ\text{C}$. Навеску листьев кукурузы гомогенизировали в объемном соотношении 1:10 в среде выделения следующего состава: 0,3 мМ дитиотриетол, 3 мМ динатриевая соль ЭДТА, 0,1 мМ хлорид кальция, 0,05% Tween-80, 0,1 М Tris-HCl буфер (pH 9.0) [8]. Полученный гомогенат центрифугировали 3 мин. при

5000 об/мин, после чего фракционировали с помощью $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ в две стадии. В результате добавления $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ от 0 до 40% насыщения с последующим центрифугированием в течении 30 минут при 12000 об/мин, был получен надосадок, демонстрирующий ГБДГ-активность. В осадке активность исследуемой ферментной системы обнаружена не была. Добавление сульфата аммония к ферментному препарату от 40 до 80% насыщения приводило к выпадению осадка, обладающего ГБДГ-активностью. В надосадочной жидкости не активности ГБДГ обнаружено не было. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 9.0) объемом 2 мл. Удаление солей аммония осуществляли путем гель-фильтрации через сефадекс G-25 (Pharmacia Uppsala, Швеция). Элюция белка осуществлялась с помощью 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 9.0). Полученный препарат подвергали ионообменной хроматографии на колонке, заполненной ДЭАЭ-Sephacel (Pharmacia Uppsala, Швеция) [9]. Десорбцию ГБДГ производили путем проведения линейного градиента NaCl от 0,05 до 0,3 М. Регистрировали два пика активности ГБДГ.

Для определения молекулярной массы нативной молекулы ГБДГ дополнительно вводили стадию гель-хроматографии через колонку (1,5x45 см), заполненную сефадексом G-200 (сверхтонкий, GE Healthcare, Швеция).

Молекулярную массу нативной молекулы очищенной ГБДГ определяли путем

регистрации объема выхода ($V_{\text{вых}}$) фермента при прохождении его через колонку, заполненную Sephadex G-200. Расчет молекулярной массы (M_r) γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы осуществляли по формуле [10]:

$$\lg M_r = 6.698 - 0.987 \frac{V_a}{V_b}, \quad (1)$$

где V_a – объем выхода фермента, см^3 ; V_b – свободный объем колонки, см^3 , который определяли с использованием голубого декстрана.

Чистоту полученных ферментных препаратов ГБДГ определяли методом гель-электрофореза в ПААГ по Дэвису при 2-4°C с последующим окрашиванием геля с помощью AgNO_3 [9, 11-13].

Проведение специфического окрашивания электрофореграмм тетразолиевым методом в присутствии в среде проявления натриевой соли γ -гидроксимасляной кислоты позволило подтвердить принадлежность полученных ферментных препаратов к γ -гидроксibuтиратдегидрогеназам [14].

Определение общего количества белка проводили по методу Лоури [15]. Опыты были проведены в трехкратной повторности, каждая проба была проанализирована трижды. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) [16].

Обсуждение результатов

В рамках исследования была проведена очистка фермента из 7-дневных зеленых листьев кукурузы и обнаружено две изоформы фермента (табл. 1). Проведение экстракции ферментов с последующей многоступенчатой очисткой позволило получить гомогенные препараты изоформ γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы из проростков *Zea mays* L.

Гомогенный препарат, подверженный центрифугированию обладал ГБДГ-активностью (величина общей активности

составляла 74.9 Е). Удельная активность экстракта составляла 1.85 Е/мг белка. Фракционирование сульфатом аммония (до 80% насыщения) и гель-фильтрация на Sephadex G-25 позволили получить ферментную вытяжку с величиной общей активности 56.57 Е, при этом, значение удельной активности составляло 5.3 Е/мг белка. Проведение ионообменной хроматографии с использованием ДЭАЭ-Sephacel позволило обнаружить два пика активности ГБДГ, которые были десорбированы NaCl линейным градиентом в интервале от 100 до 300 мМ. По итогам этой стадии первая изоформа была очищена до удельной активности 311.48 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 168.37 раза, выход составлял 11.22%. Вторая форма (ГБДГ2) получена с удельной активностью 326.84 Е/мг белка, степенью очистки 176.7 раза и выходом 7.74%.

Для определения молекулярной массы нативных молекул полученных препаратов ГБДГ была проведена стадия гель-хроматографии через Sephadex G-200. Очищенный препарат ГБДГ1 имеет молекулярную массу около 60.3 кДа. Вторая изоформа γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы характеризуется молекулярной массой порядка 286 кДа.

Применение метода ПААГ-электрофореза с проявлением электрофореграммы на белок AgNO_3 позволило установить, что оба ферментных препарата были очищены до гомогенного состояния, о чем свидетельствует наличие одной белковой полосы на электрофореграмме каждого ферментного препарата (рис. 2-3).

При помощи тетразолиевого метода проявления была определена принадлежность полученных белковых препаратов к γ -гидроксibuтиратдегидрогеназам (рис. 2-3). Значения электрофоретической подвижности для двух форм фермента составили следующие величины: для ГБДГ1 – 0.44 и ГБДГ2 – 0.13, соответственно.

Таблица 1. Стадии очистки изоформ γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы из листьев кукурузы (n=3, p \leq 0.05)

Table 1. Purification stages of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase isoforms from maize leaves (n=3, p \leq 0.05)

Стадия	V, см ³	Количество белка	E	E/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	20	40.5	74.93	1.85	100	1
Гель-хроматография через сефадекс G-200	1	0.022	7.56	343.6	10.09	185.7
	2	0.015	5.8	386.7	7.74	209.01

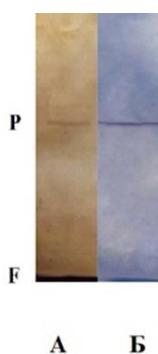


Рис. 2. Электрофореграмма очищенного препарата ГБДГ1 из проростков кукурузы. А – окрашивание ГБДГ1 с использованием AgNO₃, Б – специфическое проявление ГБДГ1, Р – белковая полоса, F – фронт красителя.

Fig. 2. Electrophoregram of purified HBDH1 preparation from maize seedlings. A: staining of HBDH1 using AgNO₃, B: specific manifestation of HBDH1, P: protein band, F: dye front.

Заклучение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что гидроксibuтиратдегидрогеназы в семидневных проростках кукурузы представлена двумя изоформами. Разработан метод очистки ГБДГ из листьев кукурузы, позволяющий получить фермент в гомогенном состоянии без потери каталитической активности. Удельная активность препаратов по итогам исследования составляла 343.6 и 386.7 Е/мг белка, соответственно.



Рис. 3. Электрофореграмма очищенного препарата ГБДГ2 из проростков кукурузы. А – окрашивание ГБДГ2 с использованием AgNO₃, Б – специфическое проявление ГБДГ2, Р – белковая полоса, F – фронт красителя.

Fig. 3. Electrophoregram of purified HBDH2 preparation from maize seedlings. A: staining of HBDH2 using AgNO₃, B: specific manifestation of HBDH2, P: protein band, F: dye front.

При этом, степень очистки для ГБДГ1 составила 10.1%, для ГБДГ2 – 7.74%.

Использование гели-хроматографии на Sephadex G-200 позволило определить молекулярную массу нативных молекул гидроксibuтиратдегидрогеназы. Установлено, что в семидневных проростках кукурузы исследуемый фермент представлен в низкомолекулярной и высокомолекулярной формах: для ГБДГ1 значение M_r составляло ~60.3 кДа, в то время как для ГБДГ2 молекулярная масса фермента равнялась 286 кДа.



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. Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A.R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in plant science*. 2008; 13(1): 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.005>
2. Busch K.B., Fromm H. Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant physiology*. 1999; 121(2): 589-598. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.589>
3. Allan W.L., Peiris C., Bown A.W., Shelp B.J. Gamma-hydroxybutyrate accumulates in green tea and soybean sprouts in response to oxygen deficiency. *Canadian Journal of Plant Science*. 2003; 83(4): 951-953. <https://doi.org/10.4141/P03-085>
4. Shelp B.J., Allan W.L., Faure D. Role of g⁻-Aminobutyrate and g⁻-Hydroxybutyrate in Plant Communication. *Plant-Environment Interactions. Signaling and Communication in Plants*. 2009; 1(1): 73-84. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89230-4_4
5. Fait A., Yellin A., Fromm H. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from Arabidopsis mutants. *FEBS letters*. 2005; 579(2): 415-420. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.004>
6. Kaplan F., Kopka J., Sung D.Y., Zhao W., Popp W., Porat R., Guy C.L. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal*. 2007; 50(6): 967-981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03100.x>
7. Coleman S.T., Fang T.K., Rovinsky S.A., Turano F.J., Moye-Rowley W.S. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(1): 244-250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007103200>
8. Taxon E.S., Halbers L.P., Parsons S.M. Kinetics aspects of Gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2020; 1868(5): 140376. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140376>
9. Selemenev V.F., SHkutina I.V., Mironenko N.V., Belanova N.A., Sinyayeva L.A., Belanova A.A., Kolomic L.N. Ob osobennostyah stroeniya aktivnogo centra i chetvertichnoj struktury inulinaz. Sorbtsionnyye i khromatograficheskie protsessy. 2023; 23(5): 741-752. <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2023.23/11692> (In Russ.)
10. Determan G. Gel'-hromatografiya: Gel'-fil'traciya. Gel'-pronikayushchaya hromatografiya. Molekulyarnye sita. Moskva, Mir. 1970. 252 p. (In Russ.)
11. Tulchin N., Ornstein L., Davis B.J. A microgel system for disc electrophoresis. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2): 485-490. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90558-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90558-3)
12. Maurer G. Disk-elektroforez: Teoriya i praktika elektroforeza v poliak-rilamidnom gele: Per. s nem. Moskva, Mir, 1971. 247 p. (In Russ.)
13. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*. 1996; 68(5): 850-858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>
14. Magalhaes J.R., Ju G.C., Rich P.J., Rhodes D. Kinetics of 15NH₄⁺ assimilation in *Zea mays*: preliminary studies with a glutamate dehydrogenase (GDH1) null mutant. *Plant Physiology*. 1990; 94(2): 647-656. <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.647>



15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis Farr A., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951; 193(1): 265-275.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

16. Lakin G.F. *Biometriya*. Moskva, Vysshaya shkola, 1990. 351 p. (in Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Г.Б. Анохина – ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

G.B. Anokhina – assistant, Ph.D (biology) department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: dowi2009@mail.ru

Е.В. Плотникова – магистр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

E.V. Plotnikova – master's degree student department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: kate_plotnikova36@mail.ru

А.Т. Епринцев – профессор кафедры биохимии и физиологии клетки, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

A.T. Eprintsev – prof., grand Ph.D (biology), head of the department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 22.02.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 22.02.2024; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723.2:577.322

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12242

Исследование особенностей взаимодействия поверхности бромелина и карбоксиметилцеллюлозы в процессе их адсорбционной иммобилизации

Мария Сергеевна Лавлинская¹, Андрей Викторович Сорокин¹,
Светлана Сергеевна Гончарова¹, Максим Сергеевич Кондратьев^{1,2},
Анастасия Алексеевна Михайлова¹, Егор Игоревич Кузнецов¹,
Никита Александрович Балбеков¹, Марина Геннадьевна Холявка^{1,3✉},
Валерий Григорьевич Артюхов¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, holyavka@ Rambler.ru✉

²Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

³Севастопольский государственный университет, Севастополь

Аннотация. Адсорбционная иммобилизация – распространенный подход для стабилизации каталитической активности ферментов, заключающийся в присоединении их макромолекул к поверхности какого-либо носителя за счет слабых физических взаимодействий и водородных связей. Согласно современным представлениям, этот процесс является наиболее «щадящей» техникой иммобилизации по отношению к структуре глобулы фермента. Однако несмотря на этот факт, часто наблюдается снижение активности иммобилизованного препарата по сравнению с нативным ферментом. Для выяснения причин этого процесса следует изучить особенности взаимодействия в системе фермент-носитель и выявить типы взаимодействий, возникающие между ее компонентами. При исследовании структуры ферментов критически важным становится установление природы и качественного состава аминокислотных остатков на поверхности макромолекулы энзима, взаимодействующих с носителем, так как в случае, если каталитически значимые остатки вовлекаются в этот процесс, может наблюдаться значительное снижение активности фермента. В связи с этим целью настоящей работы является исследование особенностей взаимодействия цистеиновой протеазы бромелина с карбоксиметилцеллюлозой с помощью десорбции фермента из образуемого комплекса в различных условиях (в присутствии сульфата аммония или поверхностно-активного вещества Тритон X-100, в том числе при различных температурах), а также методом гибкого молекулярного докинга. Выбранные объекты исследования – перспективные компоненты для получения биокатализаторов пищевого или биомедицинского назначения, поэтому исследование особенностей их взаимодействия будет способствовать расширению сфер применения бромелина. В ходе исследования установлено, что инкубация иммобилизованного на карбоксиметилцеллюлозе бромелина в растворах сульфата аммония с концентрацией 32 мМ или выше, а также Тритона X-100 с концентрацией 100 мМ или выше приводит к разрушению комплекса и десорбции фермента. Этот факт подтверждает вклад нековалентных взаимодействий в образование иммобилизованного препарата. При повышении температуры инкубации комплекса выше 60 °С также наблюдалось высвобождение фермента из препарата, что указывает на образование водородных связей между ферментом и носителем. *In silico* исследование подтвердило образование этих типов связей и взаимодействий, причем показано, что аминокислотные остатки, образующие активный центр бромелина, также связываются с носителем.

Ключевые слова: бромелин, карбоксиметилцеллюлоза, адсорбционная иммобилизация, десорбция.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект 21-74-20053.

Для цитирования: Лавлинская М.С., Сорокин А.В., Гончарова С.С., Кондратьев М.С., Михайлова А.А., Кузнецов Е.И., Балбеков Н.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Исследование особенностей взаимодействия поверхности бромелина и карбоксиметилцеллюлозы в процессе их адсорбционной иммобилизации // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 403-414. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12242>

Original article

Study of bromelain and carboxymethyl cellulose surface interaction features in the process of their adsorption immobilisation

Maria S. Lavlinskaya¹, Andrey V. Sorokin¹, Svetlana S. Goncharova¹,
Maxim S. Kondratiev^{1,2}, Anastasia A. Mikhaylova¹, Egor I. Kuznetsov¹,
Nikita A. Balbekov¹, Marina G. Holyavka^{1,3}✉, Valeriy G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia, holyavka@rambler.ru✉

²Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

³Sevastopol State University, Sevastopol

Abstract. Adsorption immobilisation is a common approach to stabilise the catalytic activity of enzymes. It involves the attachment of their macromolecules to the surface of a carrier due to weak physical interactions and hydrogen bonds. According to modern concepts, this process is the ‘gentlest’ immobilisation technique in terms of the structure of the enzyme globule. Despite this fact, the activity of the immobilised preparation is often lower compared to the native enzyme. To understand the reasons, it is necessary to study the specific features of interactions within the enzyme-carrier system and to identify the types of interactions occurring between its components. When studying the structure of enzymes, it is critical to determine the nature and qualitative composition of amino acid residues on the surface of the enzyme macromolecule that interact with the carrier. If catalytically important residues are involved in the process, there may be a significant decrease in the enzyme activity. In this regard, the aim of the work was to study the features of interaction between bromelain, which is a cysteine protease, and carboxymethyl cellulose by desorption of the enzyme from the formed complex under different conditions (in the presence of ammonium sulphate or surfactant Triton X-100, including at different temperatures), as well as by flexible molecular docking. The studied substances are promising components for the production of biocatalysts for food or biomedical applications, so the study of their interaction features will expand the applications of bromelain. We determined that incubation of bromelain immobilised on carboxymethyl cellulose in solutions of ammonium sulphate with a concentration of 32 mM or higher and Triton X-100 with a concentration of 100 mM or higher resulted in the destruction of the complex and the desorption of the enzyme. It confirms that non-covalent interactions contribute to the formation of immobilised preparation. When we increased the incubation temperature of the complex above 60 °C, we also observed the release of the enzyme from the preparation, indicating the formation of hydrogen bonds between the enzyme and the carrier. *In silico* study confirmed the formation of these types of bonds and interactions. It was determined that the amino acid residues forming the active site of bromelain also formed bonds with the carrier.

Keywords: bromelain, carboxymethyl cellulose, adsorption immobilization, desorption

Acknowledgements: the research was supported by the Russian Science Foundation as part of project No. 21-74-20053.

For citation: Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Goncharova S.S., Kondratiev M.S., Mikhaylova A.A., Kuznetsov E.I., Balbekov N.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Study of bromelain and carboxymethyl cellulose surface interaction features in the process of their adsorption immobilisation. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 403-414. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12242>

Введение

Ферменты – природные катализаторы, на порядки превосходящие по эффективности существующие в настоящий момент химические аналоги. Благодаря своей низкой токсичности энзимы находят различные сферы применения в биотехнологии, пищевой промышленности, фармации и биомедицине. Однако из-за

особенностей строения биокатализаторы чувствительны к изменениям параметров окружающей среды, в первую очередь – температуры, pH и присутствию денатурирующих агентов: резкие изменения указанных факторов в микроокружении приводят к потере нативной структуры и каталитической активности фермента [1]. Кроме того, большая часть энзимов является глобулярными водорастворимыми



белками [2], что делает невозможным многократное применение этих достаточно дорогостоящих компонентов и затрудняет их массовое внедрение в различные технологические процессы.

Доступным и эффективным способом стабилизации структуры и каталитической активности фермента является его иммобилизация – фиксация молекул энзимов на каком-либо носителе. В результате этого процесса становится возможным варьирование параметров непосредственного микроокружения макромолекулы биокатализатора и создание условий, в которых нативная структура глобулы будет минимально изменяться независимо от свойств макрофазы, в которой она находится [3-5]. Из всех известных к настоящему моменту техник иммобилизации наименее деструктивной по отношению к глобулярной структуре ферментов является адсорбционная, заключающаяся в сорбции энзима на поверхности носителя за счет образования водородных связей и прочих нековалентных взаимодействий (ван-дер-ваальсовых, лондоновских, электростатических и др.) [6, 7]. Отдельно стоит подчеркнуть, что адсорбционная иммобилизация наиболее экономически выгодна при получении биокатализаторов для пищевых или биомедицинских задач, так как не требует использования токсичных активаторов и дополнительных затрат на стадиях их введения и очистки иммобилизованного препарата от непрореагировавшего компонента.

На типы образуемых связей и взаимодействий между белком и носителем влияют свойства поверхности их молекул, в первую очередь – наличие функциональных групп, способных вступать в те или иные типы взаимодействий. Однако несмотря на достаточный накопленный массив знаний о принципах взаимодействия ферментов с различными носителями, к настоящему времени не выработан единый принцип, позволяющий вы-

брать идеальную подложку, не изменяющую каталитически выгодную структуру глобулы и не затрудняющую массоперенос субстрата и продуктов к активному центру фермента или от него. В настоящее время подбор оптимальной пары фермент-носитель осуществляется преимущественно эмпирическим путем [8]. Анализ литературных данных показывает, что в присутствии микроокружения, сформированного из полисахаридов, нарушения каталитически выгодной конформации фермента практически не наблюдается [4, 5, 9]. Однако, подобные взаимодействия все равно могут приводить к снижению активности фермента, и для выяснения причин этого процесса требуется изучение особенностей взаимодействия фермента и носителя, а также вклада различных сил в этот процесс [10].

В связи со сказанным выше, целью настоящей работы является исследование особенностей взаимодействия цистеиновой протеазы бромелина (КФ 3.4.22.32) с карбоксиметилцеллюлозой с помощью десорбции фермента из образуемого комплекса в различных условиях, а также методом гибкого молекулярного докинга. Бромелин – протеолитический фермент растительного происхождения, широко используемый в биомедицине для терапии раневых повреждений, а также в пищевой промышленности для повышения качества ряда продуктов питания, таких как хлебобулочные изделия, сыры и напитки [11-14]. Карбоксиметилцеллюлоза (схема 1) представляет собой доступный нетоксичный и биоинертный полимер, содержащий не- и ионогенные функциональные группы, что позволяет использовать ее в качестве компонента для получения катализаторов для пищевой промышленности или биомедицины [15-17].

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования был выбран бромелин из стебля *Ananas*

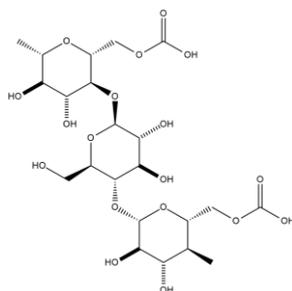


Схема 1. Схематичное изображение фрагмента макромолекулы карбоксиметилцеллюлозы со степенью замещения 0.7

Scheme 1. Schematic representation of a fragment of a carboxymethyl cellulose macromolecule with the degree of substitution of 0.7

comosus (каталожный номер В4882, Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma, США), в качестве носителя для иммобилизации использовали карбоксиметилцеллюлозу в Н-форме с молекулярной массой 90 кДа и степенью замещения 0.7 (Реахим, Россия). В экспериментах по десорбции использован сульфат аммония (ХЧ, Вектон, Россия) и Тритон Х-100 (>98%, Sigma, США)

Иммобилизация бромелина на матрице карбоксиметилцеллюлозы. К 1 г карбоксиметилцеллюлозы добавляли 20 см³ раствора фермента (в концентрации 1 мг/см³ в буфере с рН 8.6±0.01, получаемого смешением рассчитанных количеств 100 мМ раствора глицина и 100 мМ раствора NaOH), инкубировали в течение 2 часов. После окончания времени инкубации образовавшийся осадок промывали с помощью диализа против 50 мМ трис-HCl буфера (рН 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при λ=280 нм).

Содержание белка в иммобилизованных препаратах бромелина определяли методом Лоури [18]. Для экспериментов по десорбции белка перед определением его содержания иммобилизованный препарат выдерживали в растворе сульфата аммония (рН 4.9±0.02) или Тритона Х-100 в концентрации 4-500 ммоль или при температурах в интервале 20-80°C в течение

1 часа, после чего образец центрифугировали при 10 000 g и отдельно анализировали осадок и супернатант.

Методика определения протеолитической активности бромелина. Измерение протеолитической активности бромелина проводили по отношению к субстрату азоказеину (Sigma, США), как описано в [19].

Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при *p*<0.05), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

Молекулярный докинг. Подготовку структуры бромелина [20] для докинга выполняли по стандартной для Autodock Vina схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя и иных соединений. Центр молекулы и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства.

Модель структуры карбоксиметилцеллюлозы была нарисована в молекулярном конструкторе HyperChem, последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически – в PM3. Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановка зарядов на

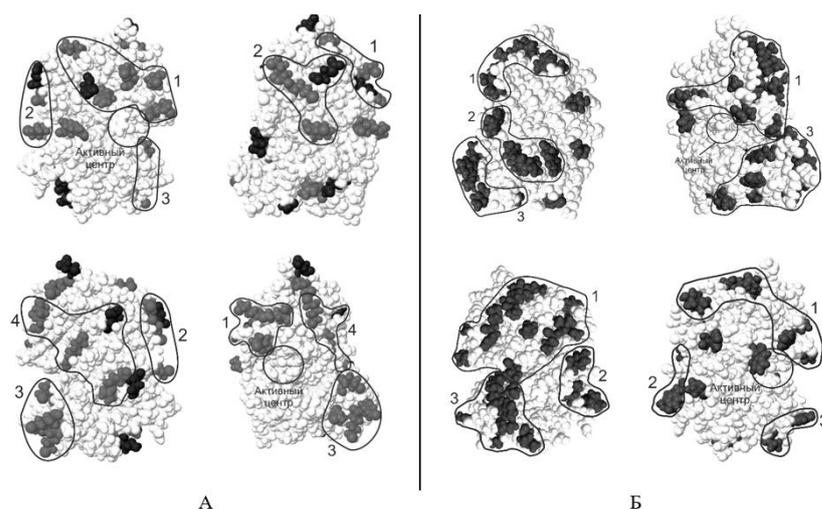


Рис. 1. Кластеры заряженных (А) и гидрофобных (Б) аминокислотных остатков на поверхности молекулы бромелина (1, 2, 3, 4 – номера кластеров; кругом обозначен активный центр фермента; каждое следующее изображение представляет собой молекулу, повернутую на 90° относительно предыдущего изображения). Для рисунка 1А: серым цветом обозначены положительно заряженные скопления, черным цветом – отрицательно заряженные.

Fig. 1. Clusters of charged (A) and hydrophobic (B) amino acid residues on the surface of a bromelain molecule (1, 2, 3, and 4 are the cluster numbers; the circle indicates active site of the enzyme; each subsequent image represents the molecule rotated by 90° relative to the previous image). In Figure 1A, grey indicates positively charged clusters and black indicates negatively charged clusters.

молекуле полисахарида и ее протонирование/депротонирование осуществлялись автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

Обсуждение результатов

Для выявления типов возможных взаимодействий, в которые может вступать поверхность глобулы бромелина нами проведен анализ поверхности 3D-модели его макромолекулы и выявлены кластеры аминокислот с различными свойствами (рис. 1). Как видно из представленных данных, на поверхности глобулы белка присутствуют скопления как заряженных, так и гидрофобных аминокислотных остатков, что указывает на возможность образования водородных связей, электростатических взаимодействий и гидрофобных эффектов, обусловленных ван-дер-ваальсовыми и лондоновскими взаимодействиями.

Для исследования взаимодействий, принимающих участие в образовании

комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза, нами проведены эксперименты по десорбции фермента в различных условиях – в присутствии сульфата аммония, Тритона X-100, а также при различных температурах. Сульфат аммония – легко растворимая в воде соль, сильный электролит, изменение концентрации которого оказывает существенное влияние на ионную силу раствора. Таким образом, варьируя этот параметр, становится возможным оценить вклад электростатических взаимодействий в образование ассоциата фермент-носитель.

Тритон X-100 (схема 2) представляет собой поверхностно-активное вещество, сочетающее в себе гидрофильную цепь полиэтиленоксида и гидрофобный ароматический фрагмент. Благодаря своей неионогенной природе этот детергент оказывает влияние преимущественно на гидрофобные эффекты, возникающие в системе бромелин-карбоксиметилцеллюлоза.

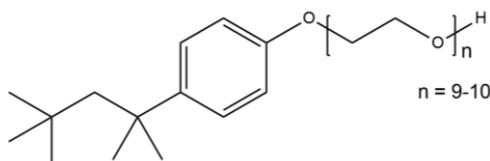


Схема 2. Схематичное изображение молекулы Тритон X-100
Scheme 2. Schematic representation of the Triton X-100 molecule

Температура также оказывает значительное влияние на процесс взаимодействия белка с элементами микроокружения. С повышением температуры повышается сегментарная подвижность глобулы бромелина, в результате чего происходит перестроение внутри- и межмолекулярных водородных связей, образующих как элементы вторичной структуры фермента, так и связей с элементами микроокружения белка, в том числе – с карбоксиметилцеллюлозой. На основании этого можно заключить, что с повышением температуры может наблюдаться частичное разрушение комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза за счет разрушения Н-связей, образованных между их макромолекулами. Таким образом, варьирование температуры и изменение содержания белка в комплексе в этих условиях можно рассматривать как косвенное подтверждение вклада водородных связей в образование комплекса.

На рисунке 2 представлены зависимости содержания белка и его общей активности в комплексе и супернатанте в зависимости от указанных выше факторов. Зависимость интенсивности процессов десорбции бромелина была исследована в присутствии сульфата аммония и Тритона X-100 в диапазоне концентраций 4-500 мМ, а также при температурах в области 25-80°C. Как видно из представленных данных, содержание белка в иммобилизованном препарате практически неизменно при концентрации сульфата аммония 32 мМ или ниже, при возрастании концентрации соли наблюдается снижение концентрации белка в препарате (осадке) и ее рост в супернатанте. Полученные данные по содержанию белка в

комплексе коррелируют с результатами определения общей активности: при концентрациях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 32 мМ и выше наблюдается снижение протеолитической активности иммобилизованного препарата (осадка) и рост активности супернатанта. Таким образом, при использовании раствора сульфата аммония с концентрацией 32 мМ или выше происходит десорбция белка с поверхности карбоксиметилцеллюлозы, причем интенсивность процесса возрастает с ростом концентрации электролита. На основании этого можно заключить, что в образовании комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза принимают участие электростатические силы.

При обработке комплекса бромелина Тритоном X-100 наблюдается снижение количества фермента и его активности в иммобилизованном препарате и возрастание значений этих параметров в супернатанте при достижении концентрации 100 мМ детергента. Таким образом, можно сделать вывод о том, что гидрофобные эффекты также вносят вклад в процесс образования комплекса белок-полисахарид, однако в меньшей степени по сравнению с электростатическими взаимодействиями. Стоит отметить, что величина общей активности препаратов в присутствии детергента значительно ниже, чем в присутствии сульфата аммония. По-видимому, это может быть связано с неспецифической адсорбцией белка на мицеллах ПАВ (критическая концентрация мицеллообразования Три-

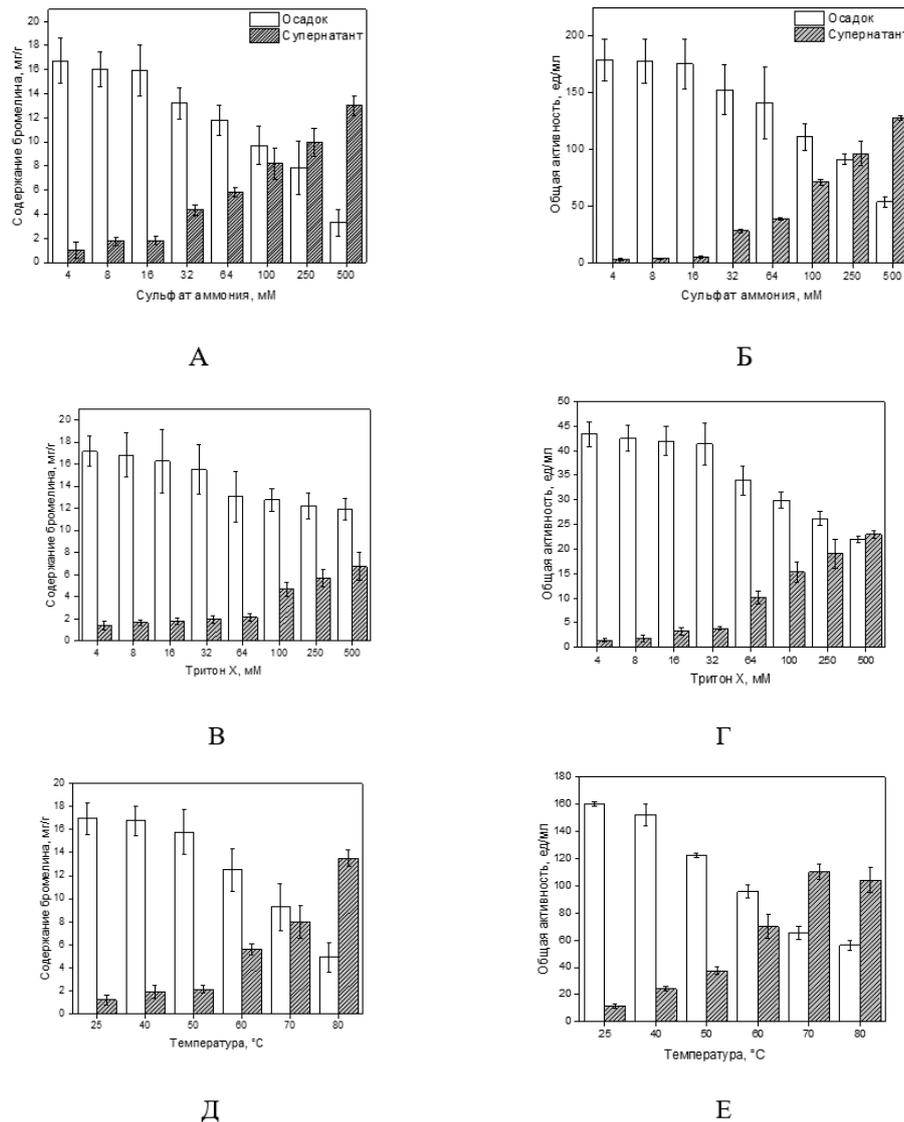


Рис. 2. Зависимость содержания белка и общей протеолитической активности бромелина в зависимости от: А, Б – присутствия сульфата аммония; В, Г – присутствия Тритона Х-100; Д, Е – температуры.

Fig. 2. The dependency of bromelain's content or proteolytic activity on: А, Б in the presence of ammonia sulfate; В, Г in the presence of Triton X-100; Д, Е at different temperatures.

тона Х-100 составляет 0.24 мМ [21]), в результате чего может происходить изменение конформации макромолекулы бромелина, связанное с переходом гидрофобных аминокислотных остатков из ядра глобулы к ее поверхности [22, 23].

Исследование зависимости содержания бромелина в комплексе с карбоксиметилцеллюлозой от температуры показывает, что при достижении 60°C наблюдается снижение количества белка в иммобилизованном препарате и его рост в

супернатанте. При 80°C, доля десорбированного белка значительно превосходит это значение для иммобилизованного, что указывает на существенный вклад водородных связей в образование комплекса. Данные зависимости общей активности комплекса и супернатанта коррелируют с содержанием белка и также свидетельствует о частичной десорбции бромелина при температурах выше 60°C.

Для детализации особенностей взаимодействия бромелина и карбоксиметилцеллюлозы было осуществлено *in silico*

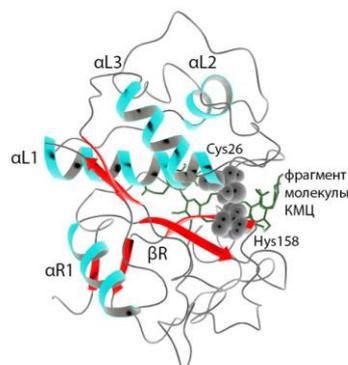


Рис. 3. Топология комплекса бромелина и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ).
 Fig. 3. Topology of the bromelain-carboxymethyl cellulose complex.

Таблица. Аминокислотные остатки бромелина, которые образуют связи и взаимодействия с карбоксиметилцеллюлозой (в скобках указана принадлежность аминокислотного остатка к упорядоченным элементам вторичной структуры белка, если скобки отсутствуют, то аминокислота входит в состав неупорядоченных участков молекулы белка)

Table. Bromelain's aminoacid residues interacting with carboxymethyl cellulose (the assignment of the aminoacid residues with the ordered elements of the secondary protein structure is indicated in brackets; if the brackets are absent, then the amino acid is part of the disordered regions of the protein)

Аминокислотные остатки, участвующие в образовании		
водородных связей, длина, Å	электростатических взаимодействий	гидрофобных эффектов, обусловленных лондоновскими и ван-дер- ваальсовыми взаимодействиями
Thr15, 3.01, 3.07; Lys18, 3.67, 3.91; Asn19, 3.8, 3.35; Gln20, 3.89, 2.98; Asn21, 3.09; Cys23, 3.31; Ser37 (α L1), 3.35; Glu51(α L2), 2.70; His158 (β R), 4.09; Lys179, 2.80; Trp180, 3.14; Tyr185, 4.09	Arg9, Lys18, His158 (β R), Arg187	Pro48 (α L1)
Количество аминокислотных остатков, участвующих в образовании связей и взаимодействий		
12 (участвуют в образовании 16 Н-связей)	4	1

исследование. Молекула бромелина представляет собой полипептидную цепь, свернутую в глобулу, в которой отчетливо выделяются два домена: L-домен, содержащий три α -спирали (α L1, α L2, α L3), и R-домен, образуемый одной α -спиралью и β -складчатостью (α R1 и β R). На их стыке образуется полость («ка-

талитический карман»), в которой расположен активный центр фермента, включающий Cys26, входящий в состав α L1-спирали, и His158, относящийся к β R-складчатости.

На рис. 3 представлена топология комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза. Молекула полисахарида локализуется в полости глобулы, что указывает на



возможность взаимодействия полигликозида как с каталитически значимыми аминокислотными остатками, так и с прочими поверхностными аминокислотами. Детализация взаимодействий по типам (таблица) показывает, что в образовании комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза преобладает вклад водородных связей (16 шт.), формируемых, в том числе, и с участием His158 – аминокислотного остатка, непосредственно входящего в активный центр фермента. В электростатические взаимодействия, представленные в виде так называемых «солевых мостиков», вступают заряженные поверхностные аминокислотные остатки Arg9, Lys18, His158, Arg187 со стороны фермента и карбоксильные группы карбоксиметилцеллюлозы. Гидрофобные эффекты представлены в минимальном количестве (только с участием Pro48), что, по-видимому, обусловлено высокой гидрофильностью карбоксиметилцеллюлозы. Отдельно стоит отметить, что комплексообразование протекает, в основном, через взаимодействия с аминокислотными остатками, относящимся к неупорядоченным областям глобулы бромелина, что обусловлено их стерической доступностью, а также с вовлечением аминокислот α L1-спирали и β R-складчатости, формирующих область

«каталитического кармана» макромолекулы. В целом, результаты молекулярного докинга и экспериментов по десорбции фермента согласуются достаточно хорошо и указывают на наличие одних и тех же типов взаимодействия.

Заключение

Таким образом, исследованы особенности взаимодействия бромелина с карбоксиметилцеллюлозой. Выявлено, что вклад в образование ассоциата между ними вносят водородные связи, электростатические взаимодействия и гидрофобные эффекты, обусловленные лондоновскими и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. Методом молекулярного докинга показано, что аминокислотные остатки, образующие активный центр фермента, вовлечены в образование комплекса, разрушение которого происходит при концентрации сульфата аммония 32 мМ и выше, для Тритона X-100 – выше 100 мМ или при температуре более 60°C.

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. Zheng Q., Wang Z., Xiong F., Zhang G., Enzyme inactivation induced by thermal stabilization in highland barley and impact on lipid oxidation and aroma profiles, *Front. Nutr.*, 2023; 10: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1097775>
2. Robinson P.K. Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays Biochem.*, 2015; 59: 1-41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
3. Secundo F. Conformational changes of enzymes upon immobilization, *Chem. Soc. Rev.*, 2013; 42: 6250-6261. <https://doi.org/10.1039/c3cs35495d>

4. Sorokin A.V., Goncharova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Faizullin D.A., Zuev Yu.F., Kondratyev M.S., Artyukhov V.G., Complexation of Bromelain, Ficin, and Papain with the Graft Copolymer of Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt and N-Vinylimidazole Enhances Enzyme Proteolytic Activity, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023; 24(14): 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms241411246>
5. Sorokin A.V., Goncharova S.S., Lavlinskaya, M.S., Holyavka M.G., Faizullin D.A., Kondratyev M.S., Kannykin S.V., Zuev Yu.F., Artyukhov V.G., Carboxymethyl Cellulose-Based Polymers as Promising Matrices for Ficin Immobilization,



- Polymers.*, 2023; 15(3): 1-23. <https://doi.org/10.3390/polym15030649>
6. Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Yu., Kondratyev M., Zakharova E., Artyukhov V., Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021; 180: 161-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016>
7. Zheng J., Van der Meeren P., Sun W., New insights into protein-polysaccharide complex coacervation: Dynamics, molecular parameters, and applications, *Aggregate*, 2023; 5(5): Article Number e449. <https://doi.org/10.1002/agt2.449>
8. Maghraby Y.R., El-Shabasy R.M., Ibrahim A.H., El-Said Azzazy H.M., Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications, *ACS Omega.*, 2023; 8(6): 5184-5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
9. Ol'shannikova S.S., Red'ko Yu.A., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Preparation of papain complexes with chitosan microparticles and evaluation of their stability using the enzyme activity level, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2022; 55(11): 1240-1244. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02564-8>
10. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M., Nakvasina M.A., Physical, chemical, and kinetic properties of trypsin-based heterogeneous biocatalysts immobilized on ion-exchange fiber matrices, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2017; 51(8): 702-706. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1678-0>
11. Holyavka M.G., Goncharova S.S., Sorokin A.V., Lavlinskaya M.S., Redko Y.A., Faizullin D.A., Baidamshina D.R., Zuev Yu.F., Kondratyev M.S., Kayumov A.R., Artyukhov V.G., Novel Biocatalysts Based on Bromelain Immobilized on Functionalized Chitosans and Research on Their Structural Features, *Polymers.*, 2022; 14(23): 1-19. <https://doi.org/10.3390/polym14235110>
12. Sorokin A.V., Olshannikova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Faizullin D.A., Zuev Yu.F., Artukhov V.G., Chitosan Graft Copolymers with N-Vinylimidazole as Promising Matrices for Immobilization of Bromelain, Ficin, and Papain, *Polymers.*, 2022; 14(11): 1-15. <https://doi.org/10.3390/polym14112279>
13. Jančić U., Gorgieva S., Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine, *Pharmaceutics.*, 2022; 14(1): 1-39. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010076>
14. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Chernov V.E., Artyukhov V.G., Second derivative analysis of synthesized spectra for resolution and identification of overlapped absorption bands of amino acid residues in proteins: bromelain and ficin spectra in the 240-320 nm range, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020; 227: 117722. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117722>
15. Sorokin A.V., Kuznetsov V.A., Lavlinskaya M.S., Synthesis of graft copolymers of carboxymethyl cellulose and N,N-dimethylaminoethyl methacrylate and their study as Paclitaxel carriers, *Polymer Bulletin.*, 2021; 78(6): 2975-2992. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03250-z>
16. Sorokin A., Sukhanov P., Popov V., Kannykin S., Lavlinskaya M., A new approach to increasing the equilibrium swelling ratio of the composite superabsorbents based on carboxymethyl cellulose sodium salt, *Cellulose.*, 2022; 29(5): 159-173. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04326-3>
17. Sorokin A.V., Goncharova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Zuev Yu.F., Faizullin D.A., Kondratyev M.S., Artyukhov V.G., Study of the Mechanism of Interaction of Ficin with a Graft Copolymer of Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt and N-vinylimidazole Using Molecular Docking, as Well as Infrared and Raman Spectroscopy, *Biophysics.*, 2023; 68(2): 182-189. <https://doi.org/10.1134/S0006350923020227>



18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

19. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R., A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*, *FEBS Lett.*, 2010; 584(21): 4419-4425. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.049>

20. Malykhina N.V., Olshannikova S.S., Holyavka M.G., Sorokin A.V., Lavlinskaya M.S., Artyukhov V.G., Faizullin D.A., Zuev Yu.F., Preparation of Ficin Complexes with Carboxymethylchitosan and N-(2-Hydroxy)Propyl-3-Trimethylammoniumchitosan and Studies of Their Structural Features, *Russ. J. Bioorganic Chem.*, 2023; 48(S1): S50-S60. <https://doi.org/10.1134/S1068162022060176>

21. Machado A.E. da H., de Oliveira H.P.M., dos Santos L.M., Alves H. de O., Machado W.A., Caixeta B.P., da Silva, T.A., Araújo D.M. da S., Determination of the Critical Micelle Concentration of Triton X-100 Using the Compound 3-(benzoxazol-2-yl)-7-(N,N-diethylamino)chromen-2-one as Fluorescent Probe, *Orbital: Electron. J. Chem.*, 2016; 8(6): 329-333. <https://doi.org/10.17807/orbital.v0i0.923>

22. Yadav J.K., Prakash V., Stabilization of α -Amylase, the Key Enzyme in Carbohydrates Properties Alterations, at Low pH, *Int. J. Food Prop.*, 2011; 14(6): 1182-1196. <https://doi.org/10.1080/10942911003592795>

23. van Dijk E., Hoogeveen A., Abeln S., The Hydrophobic Temperature Dependence of Amino Acids Directly Calculated from Protein Structures, *PLoS Comput. Biol.*, 2015; 11(5): 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004277>

Информация об авторах / Information about the authors

М.С. Лавлинская – к.х.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.В. Сорокин – к.б.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

С.С. Гончарова – младший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

М.С. Кондратьев – к. ф.-м. н., заведующий лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем, Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино Московской области; старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.А. Михайлова – студент кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Е.И. Кузнецов – студент кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

M.S. Lavlinskaya – PhD (Chem), Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia; e-mail: maria.lavlinskaya@gmail.com

A.V. Sorokin – PhD (Biol) Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: andrew.v.sorokin@gmail.com

S.S. Goncharova – Junior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: olshannikovas@gmail.com

M.S. Kondratyev – PhD (Physics), Head of the Laboratory of Structure and Dynamics of Biomolecular Systems, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino; Senior, Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: ma-ko@bk.ru

A.A. Mikhaylova – Student, Polymer Science and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: minas36@yandex.ru

E.I. Kuznetsov – Student, Polymer Science and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: kuznetsoffegorr@gmail.com



Н.А. Балбеков – студент кафедры физической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

М.Г. Холявка – д.б.н., доц., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж; профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета, Севастополь, Россия

В.Г. Артюхов – д.б.н., проф., заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

N.A. Balbekov – Student, Physical Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: balbekov.nikita@yandex.ru

M.G. Holyavka – Doctor of Science (Biol), professor, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, Russia, e-mail: holyavka@rambler.ru

V.G. Artyukhov – Doctor of Science (Biol), professor, Head of the Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 15.04.2024; одобрена после рецензирования 10.05.2024; принята к публикации 15.05.2024.

The article was submitted 15.04.2024; approved after reviewing 10.05.2024; accepted for publication 15.05.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 615.07:543.544: 519.876

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12243

Влияние ресвератрола на сорбцию фосфорилированного tau-белка и MART на PVDF-мембрану в мышинной модели болезни Альцгеймера

Екатерина Владимировна Чернышова¹, Екатерина Павловна Крутских¹,
Полина Ивановна Бабенкова¹, Вероника Витальевна Нестерова¹,
Ирина Борисовна Певзнер², Егор Юрьевич Плотников²,
Артем Петрович Гуреев^{1,3}✉

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, gureev@bio.vsu.ru✉

²НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

³Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Аннотация. Болезнь Альцгеймера – это комплексное нейродегенеративное заболевание, в основе которого лежат различные процессы, связанные с накоплением и агрегацией дефектных белков. Среди них особое значение имеют амилоид- β , образующийся при расщеплении белка-предшественника амилоида, скопление внутри нейронов гиперфосфорилированных белков tau, образующих нейрофибрилярные клубки, а также aberrantная агрегация и образование включений связанного с микротрубочками белка tau (MART). Трансгенные мыши линии APP/PS1 являются моделью болезни Альцгеймера и экспрессируют мутантные человеческие гены, способствующие накоплению пептидов амилоида- β в мозге. Целью данной работы являлась количественная оценка уровня p-tau231 с использованием сорбционного метода в мозге трансгенных мышей с моделью БА. Также к задачам исследования относилась проверка способности природного полифенола ресвератрола снижать концентрацию p-tau231 в мозге трансгенных мышей и улучшить когнитивные функции. Широко распространенным методом иммунного обнаружения и количественного определения белков *in vitro* является вестерн-блоттинг. Вестерн-блоттинг позволяет разделить белки в зависимости от их молекулярной массы с последующим переносом на адсорбционную мембрану. При этом перенос белков из геля на мембрану PVDF осуществляется с помощью электрофоретической элюции. Этот метод включает помещение белоксодержащего полиакриламидного геля в непосредственный контакт с мембраной PVDF, которая представляет собой линейный полимер с повторяющимися звеньями $-(CF_2-CH_2)-$. Белки, перенесенные на мембрану, хорошо удерживаются на ее поверхности на протяжении всего процесса иммунодетекции за счет сочетания дипольных и гидрофобных взаимодействий. Вестерн-блоттинг показывает, что в мозге у мышей с нарушенной агрегацией белков накапливается значительно больше MART и фосфорилированного tau-белка, чем у мышей дикого типа. К тому же, в тесте водного лабиринта Морриса у данных мышей наблюдались когнитивные дефициты, которые проявлялись как в затруднении поиска платформы, так и в более тревожном поведении, что подчеркивает ярко выраженный тигмотаксис. Природный полифенол ресвератрол частично нивелировал когнитивные дефициты, хотя данный эффект не был связан со снижением уровня фосфорилированного tau и MART.

Ключевые слова: вестерн-блоттинг, сорбционная мембрана, tau-белок, болезнь Альцгеймера, ресвератрол.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 22-74-00115.

Для цитирования: Чернышова Е.В., Крутских Е.П., Бабенкова П.И., Нестерова В.В., Певзнер И.Б., Плотников Е.Ю., Гуреев А.П. Влияние ресвератрола на сорбцию фосфорилированного TAU-белка и MART на PVDF-мембрану в мышинной модели болезни Альцгеймера // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 415-425. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12243>



Original article

Influence of resveratrol on the sorption of phosphorylated tau protein and MAPT on the PVDF membrane in a mouse model of Alzheimer's disease

**Ekaterina V. Chernyshova¹, Ekaterina P. Krutskikh¹, Polina I. Babenkova¹,
Veronika V. Nesterova¹, Irina B. Pevzner², Egor Yu. Plotnikov², Artem P. Gureev^{1,3}**[✉]

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia, gureev@bio.vsu.ru[✉]

²A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

³Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia

Abstract. Alzheimer's disease is a complex neurodegenerative disease based on various processes associated with the accumulation and aggregation of defective proteins. Among them, the particularly important ones are the following: amyloid- β , which is formed by the breakdown of amyloid precursor protein, the accumulation of hyperphosphorylated tau proteins inside neurons that form neurofibrillary tangles, and aberrant aggregation and inclusion formation of microtubule-associated protein tau (MAPT). APP/PS1 transgenic mice act as a model of Alzheimer's disease and express mutant human genes that cause the accumulation of amyloid- β peptides in the brain. The goal of this work was a quantitative assessment of the level of p-tau231 in the brain of transgenic mice with a model of AD using the sorption method. The objectives of the study also included testing the ability of the natural polyphenol resveratrol to reduce the concentration of p-tau231 in the brain of transgenic mice and improve their cognitive functions. Western blot is a widely used method for the immunodetection and in vitro quantitative determination of proteins.

Western blot allows separating proteins based on their molecular weight with the further transfer to an adsorption membrane. In this case, the proteins are transferred from the gel to the PVDF membrane using electrophoretic elution. This method involves placing a protein-containing polyacrylamide gel in direct contact with a PVDF membrane represented by a linear polymer with repetitive links $-(CF_2-CH_2)-$. Proteins transferred to the membrane are well-retained on its surface during the whole immunodetection process due to a combination of dipole and hydrophobic interactions. Western blot showed that mice with impaired protein aggregation accumulated significantly more MAPT and phosphorylated tau protein in the brain as compared to wild mice. In addition, in the course of the Morris water maze test, these mice showed cognitive deficits, which manifested both in the difficulty of finding the platform and more anxious behaviour, which confirmed pronounced thigmotaxis. The natural polyphenol resveratrol partially reversed cognitive deficits, although this effect was not associated with decreased levels of phosphorylated tau and MAPT.

Keywords: Western blot, adsorption membrane, Tau protein, Alzheimer's disease, resveratrol.

Acknowledgements: the reported study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 22-74-00115.

For citation: Chernyshova E.V., Krutskikh E.P., Babenkova P.I., Nesterova V.V., Pevzner I.B., Plotnikov E.Yu., Gureev A.P. Influence of resveratrol on the sorption of phosphorylated tau protein and MAPT on the PVDF membrane in a mouse model of Alzheimer's disease. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 415-425. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12243>

Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой нейродегенеративное заболевание головного мозга, при котором происходит прогрессирующее разрушение нейронов и нарушение когнитивных функций, таких как память, речь и мышление. Прогрессирование этих поражений головного мозга медленно, но необратимо снижает автономию человека [1]. Агрегация белков является общей чертой многих нейродегенеративных заболева-

ний, и предполагается, что процесс агрегации играет центральную роль в патогенезе [2]. В этом процессе мономер растворимого белка взаимодействует с другими мономерами того же белка, образуя димеры, олигомеры и полимеры. Агрегация часто сопровождается конформационными изменениями трехмерной структуры белка. БА патологически определяется внеклеточным накоплением пептидов амилоида- β ($A\beta$), образующихся при расщеплении белка-предшественника амилоида (APP) а также скоплением

внутри нейронов гиперфосфорилированных белков tau (p-tau), образующих нейрофибрилярные клубки (NFTs) [3]. Поэтому для определения патологии БА важно определить количество фосфорилированного белка. Для этого используют различные методы, среди них, например, масс-спектрометрия, иммуноферментные анализы, а также вестерн-блоттинг [4-6]. Вестерн-блоттинг при этом считается золотым стандартом для количественного определения фосфорилированных белков, в основе которого лежит анализ количества белка, сорбированного на PVDF мембрану с использованием специфических антител [7].

Из всех различных посттрансляционных модификаций, которым может подвергаться белок tau, фосфорилирование представляет особый интерес из-за его участия в группе нейродегенеративных расстройств, известных как тауопатии [8, 9]. Фосфорилированный tau по треонину 231 (p-tau231) является одним из биомаркеров БА в спинномозговой жидкости и имеет высокую диагностическую точность. Рядом исследований установлено, что p-tau спинномозговой жидкости коррелирует с когнитивными нарушениями даже в большей степени, чем биомаркеры, связанные с A β [10-12]. Недавние клинические испытания потенциальных препаратов для лечения БА, направленных на снижение уровня A β , не привели к замедлению прогрессирования заболевания у пациентов с БА [13]; это дает основания полагать, что необходимо разработать альтернативную стратегию воздействия, которая может быть направлена на препятствие агрегации p-tau. В настоящее время ведется активная разработка препаратов, направленных на деагрегацию белков при БА [14]. Полифенольные растительные соединения рассматриваются как перспективные препараты для лечения БА, среди которых особый интерес вызывает ресвератрол [15].

Целью данной работы являлась количественная оценка уровня p-tau231 с использованием сорбционного метода в мозге трансгенных мышей с моделью БА. Также к задачам исследования относилась проверка способности природного полифенола ресвератрола снижать концентрацию p-tau231 в мозге трансгенных мышей и улучшить когнитивные функции.

Экспериментальная часть

Животные. Трансгенные мыши APP/PS1 (генотип B6C3-Tg(APP695)85Dbo Tg(PSEN1)85Dbo) были получены из Пущинского питомника лабораторных животных (Пущино, Россия). Животные содержались в контролируемых условиях: цикл 12 часов свет и 12 часов темноты, температура 25 °C, неограниченный доступ к воде и стандартная лабораторная диета (Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Германия). Мыши APP/PS1, в возрасте 6 месяцев, были разделены на две группы. Первая группа (n=6) получала только воду, а вторая группа (n=7) мышей с питьевой водой получала ресвератрол (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мг/кг/день. Предварительно нами было установлено, что в день каждая мышь весом примерно 20 г выпивает 4 см³ воды; для каждой мыши прием ресвератрола в дозе 20 мг/кг/день достигался разведением 100 мг ресвератрола в 1 дм³ воды, при котором одна мышь ежедневно в среднем получала 0.4 мг ресвератрола. Вода и корм были доступны *ad libitum*. Количество потребляемой воды и корма контролировали ежедневно в течение всего срока эксперимента. Концентрация 20 мг/кг/день была подобрана ранее и уже использовалась нами в предыдущих исследованиях на не трансгенных мышях [16]. Доказано, что данная концентрация ресвератрола не вызывает побочных эффектов, хорошо переносится и фармакологически безопасна в дозах до 5 г/день

[17]. В качестве контроля были задействованы мыши линии C57BL/6 ($n=7$), которые не получали никаких добавок. Прием препарата продолжался в течение 4 месяцев. По окончании этого периода был проведен тест водного лабиринта Морриса для оценки пространственной долговременной памяти, в котором участвовали все экспериментальные мыши. Далее мыши были умерщвлены согласно правилам этической комиссии Воронежского государственного университета. Головной мозг мышей извлекали и немедленно замораживали при температуре -80°C в низкотемпературном вертикальном морозильнике MDF-U3386S (SANYO, Япония) для последующих исследований белков. Для анализа использовались по 4 образца мозга с каждой экспериментальной группы.

Вестерн-блоттинг. Вестерн-блоттинг осуществлялся в нескольких этапах: пробоподготовка, электрофорез в полиакриламидном геле, перенос белков на сорбционную PVDF мембрану, нанесение первичных антител на сорбционную мембрану, нанесение вторичных антител, визуализация результатов. Использовали целое полушарие мозга мыши и гомогенизировали в фосфатном буфере в соотношении 1:100. Затем гомогенат центрифугировали 3 мин при 1000 g. После отбирали супернатант (65 мкл) и добавляли загрузочный буфер (0.756 г Трис, 1г SDS, 10 см³ глицина, 5 см³ меркаптоэтанол, 1 мг бромфенолового синего, pH 6.8 с HCl в 100 см³ раствора), таким образом, чтобы концентрация белка во всех пробах была одинаковой. Концентрацию белка в супернатанте определяли с помощью набора Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kits. Пробу смешивали с буфером в соотношении примерно 3:1 и кипятили в термостате 5 мин при 100°C , затем давали образцам остыть.

Разделение белков проводили с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Для этого приготавливали концентрирующий гель (1 см³

раствора акриламида-бисакриламида, 1 см³ буфера для концентрирующего геля (Трис-HCl, pH 6.8), 3 см³ воды, 24 мкл ТЕМЕД, 160 мкл персульфат аммония (ПСА)) и разделяющий гель (12.5%) (8.3 см³ раствора акриламида-бисакриламида, 5 см³ буфера для разделяющего геля (Трис-HCl, pH 8.8), 6.6 см³ воды, 24 мкл ТЕМЕД, 160 мкл ПСА). Для проведения электрофореза на прибор подавали электрический ток с напряжением 200 мВ, силой тока 12 мА.

Перенос образцов осуществляли на сорбционную мембрану PVDF (Immobilon®-P PVDF Membrane), которая представляет собой линейный полимер с повторяющимися звеньями $-(\text{CF}_2-\text{CH}_2)-$ [18]. Перед началом полусухого переноса мембрану активировали в метаноле в течение 1 мин, затем метанол сливали и заливали мембрану буфером для переноса (25 мМ TRIS, 190 мМ глицина, 10% метанола) на 15 мин. Собирали систему «сэндвич» и проводили перенос при напряжении 25 В и силе тока 0.5 А в течение 30 мин. После переноса сорбционную мембрану PVDF блокировали в 5% обезжиренном сухом молоке и 30 см³ буфера TBS с Tween в течение 30 мин. После переноса мембрану отмывали и заливали антителами разбавленными 1% BSA в 1X TBS с Tween. Использовались следующие антитела: mouse monoclonal anti-b-actin 1:2000 (#A2228, Sigma, США), MAP tau total Rb 1:1000 (#PA1-18272, Thermo, США), Tau [p205] Rb 1:1000 (#44738G, Invitrogen, США). PVDF мембрану с первичными антителами инкубировали в течение ночи при 4°C . В течение этого процесса антитела связывались с целевыми белками, перенесенными на мембрану. После инкубации мембрану отмывали 3 раза в течение 5 мин при 70 rpm. Затем инкубировали мембрану со вторичными антителами, которые были конъюгированы с пероксидазой хрена, в соотношении 1:5000 при

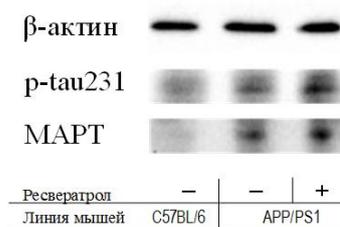


Рис. 1. Различия в концентрации сорбированных на мембране p-tau и MAPT у трансгенных мышей (APP/PS1) без лечения и при приеме ресвератрола в сравнении с мышами дикого типа (линия C67BL/6)

Fig. 1. Differences in the concentrations of p-tau and MAPT sorbed on the membrane in transgenic mice (APP/PS1) without treatment and with resveratrol treatment as compared to wild mice (line C67BL/6)

36-37°C в течение 60 мин. После инкубации мембрану отмывали 3 раза. Для проявления добавляли субстрат Clarity™ Western ECL для хемилюминесцентной детекции конъюгатов с пероксидазой хрена (HPR) согласно рекомендациям производителя и инкубировали в течение 5 мин. Регистрацию блотов проводили на приборе Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad, USA).

Тест водного лабиринта Морриса. Для оценки когнитивных способностей мышей был использован тест водного лабиринта Морриса, основанный на протоколе, разработанном Vorhees и Williams (2006) [19]. Лабиринт представлял собой бассейн, заполненный водой, который был разделен на четыре квадранта: северный (N), южный (S), восточный (E) и западный (W). Оценка пространственной долговременной памяти проводилась на 6-й день эксперимента после 5 дней обучения. Оценивалось, какое количество мышей добиралось до платформы, и какой при этом был характер поиска платформы.

Статистическая обработка. Данные представлены в виде медианных значений (Q1; Q3). Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ STATISTICA12. Сравнение между экспериментальными группами проводилось при помощи непараметрического критерия Крускала-Уоллиса, так как распределение данных отличалось от нормального.

Обсуждение результатов

Связь между накоплением A β и развитием БА может объясняться ускоренной сборкой агрегатов, что, в свою очередь, повреждает холинергические нейроны, приводит к чрезмерному накоплению и активации микроглии, вызывающей нейровоспаление. Это, в свою очередь, влияет на энергетический метаболизм, в котором ведущую роль играют митохондрии, что приводит к окислительному стрессу и аномальному фосфорилированию белка tau [20]. Ранее было показано, что p-tau231 накапливается на ранних стадиях развития патологии БА и является основным кандидатом для обнаружения начинающейся патологии A β [21]. По результатам вестерн-блоттинга было продемонстрировано, что первичные антитела специфичные к p-tau231 в большей степени сорбировались на PVDF мембране, на которую были перенесены разделенные с помощью электрофореза белки из гомогената мозга трансгенных мышей с БА (рис. 1-2). Анализ толщины бэндов с помощью ПО ImageJ показал, что уровень p-tau231 у трансгенных мышей в 3.4 раза выше, чем у мышей дикого типа (p<0.05) (рис. 2A).

Ранее аналогичные результаты были получены также в гиппокампе мышей линии APP/PS1 [22]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что накопление p-tau231 в головном мозге может служить

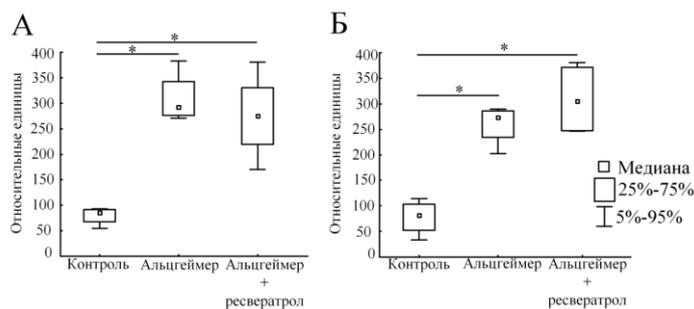


Рис. 2. Уровень белка p-tau (А) и MAPT (Б) в гомогенате мозга мышей экспериментальных групп
 Fig. 2. Protein levels of p-tau (A) and MAPT (B) in the brain homogenate of mice from experimental groups

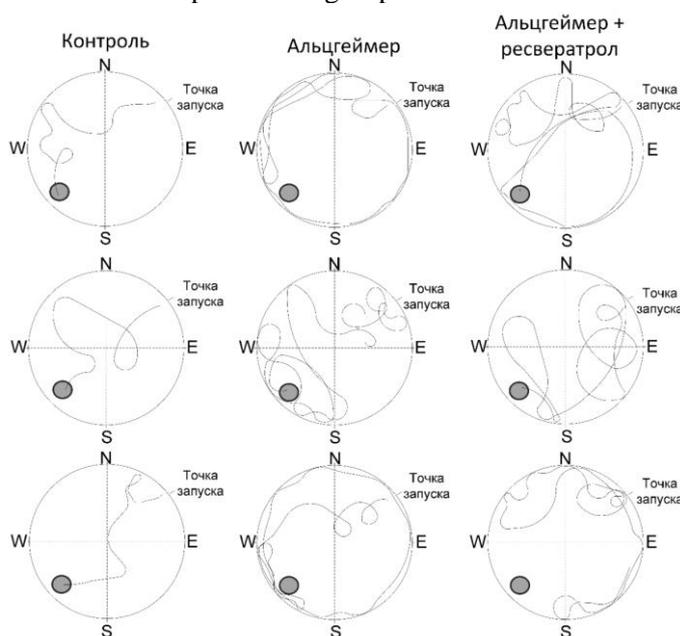


Рис. 3. Репрезентативные примеры траекторий движения в водном лабиринте Морриса мышей дикого типа (первый столбец), трансгенных мышей не получавших добавки (второй столбец) и трансгенных мышей, получавших предварительно ресвератрол.

Fig. 3. Representative examples of movement trajectories in the Morris water maze of wild mice (first column), transgenic mice without treatment (second column), and transgenic mice with preliminary resveratrol treatment

достаточно точным предиктором когнитивных нарушений уже на ранних стадиях БА.

Водный лабиринт Морриса показал, что 100% контрольных мышей дикого типа находили платформу в течение 60 секунд тестовой попытки, при этом практически все мыши целенаправленно двигались к платформе (рис. 3-4). Медианная дистанция, которую преодолевали контрольные мыши дикого типа, составляла 733 мм (444; 1194), контрольные мыши

линии APP/PS1 проплывали дистанцию 5974 мм (4731; 8109), трансгенные мыши, получавшие ресвератрол, проплывали в поисках платформы 4755 мм (2716; 5402). Это может свидетельствовать о том, что у трансгенных мышей нарушены когнитивные способности, в частности, процесс запоминания места расположения платформы, что выражается в статистически достоверном увеличении проплываемой дистанции ($p < 0.001$). При этом у

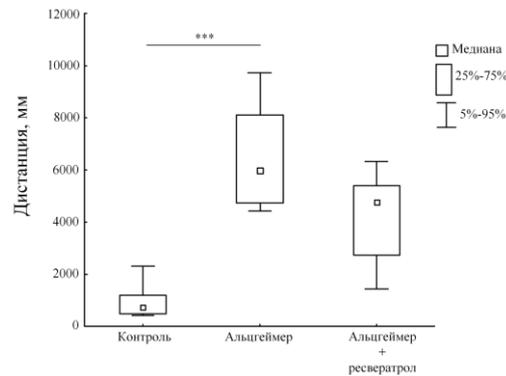


Рис. 4. Дистанция, которую мыши проплывали до нахождения платформы в тесте водного лабиринта Морриса

Fig. 4. The swimming distance that mice covered to find the platform in the Morris water maze test

трансгенных мышей, получавших ресвератрол, когнитивные дефициты менее ярко выражены, и статистически значимых различий с мышами дикого типа обнаружено не было. Трансгенные мыши, не получавшие ресвератрол, находили платформу менее чем в 20% случаев, при этом траектория поиска платформы свидетельствует о том, что у этих мышей был ярко выражен тигмотаксис. Тигмотаксис – это особенность поведения животного при различных неврологических патологиях, в том числе и при БА, связанная со склонностью перемещаться по краю окружающей среды [23]. Такое поведение используется в качестве маркера стресса и когнитивных нарушений у грызунов в тесте водного лабиринта Морриса [24;25]. Таким образом, результаты теста подтверждают корреляцию тигмотаксического поведения с увеличением количества p-tau у трансгенных мышей.

При этом было показано, что природный полифенол ресвератрол не способствовал снижению уровня p-tau²³¹, о чем свидетельствует толщина бэндов, которые были получены при проявлении антител, связанных с белками p-tau²³¹, сорбированных на PVDF мембрану. Ранее Miyasaka et al. показали, что лечение другим растительным полифенолом куркумином трансгенных *Caenorhabditis elegans* с tau-индуцированной дисфункцией нейронов также существенно не

влияло на агрегацию p-tau, но улучшало функции нейронов и стабилизировало микротрубочки [26]. В двух других исследованиях изучалось влияние ресвератрола на белок tau у мышей, при этом Porquet et al. обнаружили снижение соотношения p-tau и tau, в то время как в исследованиях Varamini et al. подобных различий не было продемонстрировано [27;28]. Одно из возможных объяснений полученных результатов заключается в том, что это соединение может блокировать или обращать вспять поздние стадии агрегации гиперфосфорилированного tau, тем самым уменьшая количество клубков, но приводя к накоплению (непосредственно перед точкой блокировки) относительно более растворимых форм гиперфосфорилированного tau. Другими словами, гиперфосфорилированный tau может связывать ресвератрол и стабилизироваться в относительно растворимой форме, предотвращая агрегацию tau в клубочки. Это также приведет к увеличению количества экстрагируемого гиперфосфорилированного tau. И наоборот, отсутствие ресвератрола может позволить гиперфосфорилированному tau агрегировать в нерастворимые клубки, тем самым увеличивая количество клубков, видимых в срезах мозга, и уменьшая количество растворимого гиперфосфорилированного tau [29]. В целом, tau по-разному

фосфорилируется в более чем 30 участках мозга при БА по сравнению с нормой. Хотя за фосфорилирование ответственны несколько киназ, включая CDK5 и GSK3 β , протеинфосфатаза 2A (PP2A) является основной фосфатазой p-tau в мозге [30]. Каталитическая субъединица PP2A (PP2Ac) и ее регуляторная субъединица $\alpha 4$ взаимодействуют с ассоциированной с микротрубочками убиквитинлигазой MID1. После образования комплекса MID1 опосредует убиквитин-специфичную модификацию PP2Ac и его деградацию с помощью протеасомы, тем самым обеспечивая высокоспецифичный режим регуляции, центрированный в микротрубочках, для PP2A [31]. Ресвератрол, по-видимому, мешает этому взаимодействию и выступает в роли посредника в повышении активности PP2A, специфичной для микротрубочек. Лечение ресвератролом напрямую влияет на комплекс деградации MID1- $\alpha 4$ -PP2A, снижая экспрессию белка MID1 *in vitro* и *in vivo*. Это приводит к увеличению активности PP2A, связанной с микротрубочками, и зависимо от времени и дозы дефосфорилированию p-tau [32].

При множественных нейродегенеративных заболеваниях, включая БА, характерной патологической особенностью является aberrантная агрегация и образование включений связанного с микротрубочками белка tau (МАРТ) [33;34]. МАРТ представляет собой внутренне неупорядоченный белок, экспрессирующийся в нейронах центральной нервной системы [35]. Мутации гена МАРТ могут оказывать несколько различных эффектов на функции и свойства tau. Эти эффекты могут перекрываться или полностью различаться в зависимости от мутации, но все они приводят к образованию

агрегированных tau-включений с гибелью и атрофией нейронов [34]. Аналогичным образом, у трансгенных мышей уровень белка МАРТ был увеличен в 3,4 раза по сравнению с контрольными мышами ($p < 0.05$), тогда как ресвератрол не оказывал значительного эффекта на количество данного белка. Уровень МАРТ в группе трансгенных мышей, получавших ресвератрол был в 3.9 раз выше, чем в контрольной группе ($p < 0.05$) (рис. 1,2Б). Ранее было показано, что экспрессия МАРТ в мозге увеличивается при тауопатиях, в том числе при БА [36].

Заключение

С помощью сорбционных методов нами было показано, что в мозге у трансгенных мышей линии APP/PS1 увеличивается уровень p-tau и белка МАРТ, что также наблюдается и в мозге пациентов с БА. Наши исследования продемонстрировали, что природный полифенол ресвератрол частично нивелирует когнитивные дефициты, вызванные накоплением неправильно свернутых и гиперфосфорилированных белков, но при этом, не оказывает влияния на их содержание в мозге. Таким образом, ресвератрол может рассматриваться как препарат для улучшения памяти при данной форме деменции, но при этом он не может влиять на одну из первопричин развития БА.

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.

Nguyen C. The Eye As a Biomarker for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2016; 10: 536.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00536>

Список литературы/References

1. Lim J., Li Q., He Z., Vingrys A., Wong V., Currier N., Mullen J., Bui B.,



2. Moda F., Ciullini A., Dellarole I., Lombardo A., Campanella N., Bufano G., Cazzaniga F., Giaccone G. Secondary Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases: Almost the Rule Rather than the Exception. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023; 28(10): 255. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2810255>
3. Irvine G., El-Agnaf O., Shankar G. *et al*. Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Mol. Med.* 2008; 14: 451–464. <https://doi.org/10.2119/2007-00100.irvine>
4. Previs M., VanBuren P., Begin K., Vigoreaux J., LeWinter M., Matthews D. Quantification of protein phosphorylation by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2008; 80(15): 5864-72. <https://doi.org/10.1021/ac800337v>
5. Bass J., Wilkinson D., Rankin D., Phillips B., Szewczyk N., Smith K., Atherton P. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports.* 2017; 27(1): 4-25. <https://doi.org/10.1111/sms.12702>
6. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull World Health Organ.* 1976; 54(2): 129-39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2366430/>
7. Mishra M., Tiwari S., Gomes A. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics.* 2017; 14(11): 1037-1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
8. Goedert M., Wischik C., Crowther R., Walker J., Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(11): 4051-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.11.4051>
9. Arendt T., Stieler J., Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Res Bull.* 2016; 126(3): 238-292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
10. Blennow K., Hampel H., Weiner M., Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2010; 6(3): 131-44. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.4>
11. Jack C., Wiste H., Botha H., Weigand S., Therneau T., Knopman D., Graff-Radford J., Jones D., Ferman T., Boeve B., Kantarci K., Lowe V., Vemuri P., Mielke M., Fields J., Machulda M., Schwarz C., Senjem M., Gunter J., Petersen R. The bivariate distribution of amyloid- β and tau: relationship with established neurocognitive clinical syndromes. *Brain.* 2019; 142(10): 3230-3242. <https://doi.org/10.1093/brain/awz268>
12. Aschenbrenner A., Gordon B., Benzinger T., Morris J., Hassenstab J. Influence of tau PET, amyloid PET, and hippocampal volume on cognition in Alzheimer disease. *Neurology.* 2018; 91(9): e859-e866. <https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000006075>
13. Pillai J., Cummings J. Clinical trials in predementia stages of Alzheimer disease. *Med Clin North Am.* 2013; 97(3): 439-57. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.01.002>
14. Bukhari S. Dietary Polyphenols as Therapeutic Intervention for Alzheimer's Disease: A Mechanistic Insight. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(3): 554. <https://doi.org/10.3390/antiox11030554>
15. Islam F., Nafady M., Islam M. *et al*. Resveratrol and neuroprotection: an insight into prospective therapeutic approaches against Alzheimer's disease from bench to bedside. *Mol Neurobiol.* 2022; 59: 4384-4404. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02859-7>
16. Sadovnikova I., Gureev A., Ignatyeva D., Gryaznova M., Chernyshova E., Krutskikh E., Novikova A., Popov V. Nrf2/ARE Activators Improve Memory in Aged Mice via Maintaining of Mitochondrial Quality Control of Brain and the Mod-



- ulation of Gut Microbiome. *Pharmaceuticals*. 2021; 14(7): 607. <https://doi.org/10.3390/ph14070607>
17. Patel K., Scott E., Brown V., Gescher A., Steward W., Brown K. Clinical trials of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1215: 161-169. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05853.x>
18. Mohammadpourfazeli S., Arash S., Ansari A., Yang S., Mallick K., Bagherzadeh R. Future prospects and recent developments of polyvinylidene fluoride (PVDF) piezoelectric polymer; fabrication methods, structure, and electro-mechanical properties. *RSC Adv*. 2023; 13(1): 370-387. <https://doi.org/10.1039/d2ra06774a>
19. Vorhees C., Williams M. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006; 1(2): 848-58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
20. Wang Y., Wang K., Yan J., Zhou Q., Wang X. Recent Progress in Research on Mechanisms of Action of Natural Products against Alzheimer's Disease: Dietary Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(22): 13886. <https://doi.org/10.3390/ijms232213886>
21. Ashton N., Benedet A., Pascoal T., Karikari T., Lantero-Rodriguez J., Brum W., Mathotaarachchi S., Therriault J., Savard M., Chamoun M., Stoops E., Francois C., Vanmechelen E., Gauthier S., Zimmer E., Zetterberg H., Blennow K., Rosa-Neto P. Cerebrospinal fluid p-tau231 as an early indicator of emerging pathology in Alzheimer's disease. *EBioMedicine*. 2022; 76: 103836. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103836>
22. Cheng C., Lin K., Hong C., Wu D., Chang H., Liu C., Hsiao I., Yang C., Liu Y., Hu C. Plasmon-Activated Water Reduces Amyloid Burden and Improves Memory in Animals with Alzheimer's Disease. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 13252. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49731-8>
23. Mayagoitia K., Tolan A., Shammi S., Shin S., Menchaca J., Figueroa J., Wilson C., Bellinger D., Ahmed A., Soriano S. Loss of APP in mice increases thigmotaxis and is associated with elevated brain expression of IL-13 and IP-10/CXCL10. *Physiol Behav*. 2021; 240: 113533. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113533>
24. Yan H., Wenxia Z., Yongxiang Z. Bright lighting conditions during testing increase thigmotaxis and impair water maze performance in BALB/c mice, *Behavioural Brain Research*. 2012; 226(1): 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.043>
25. Higaki A., Mogi M., Iwanami J., Min L-J., Bai H-Y., Shan B-S., et al. Recognition of early stage thigmotaxis in Morris water maze test with convolutional neural network. *PLoS ONE*. 2018; 13(5): e0197003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197003>
26. Miyasaka T., Xie C., Yoshimura S., Shinzaki Y., Yoshina S., Kage-Nakadai E., Mitani S., Ihara Y. Curcumin improves tau-induced neuronal dysfunction of nematodes. *Neurobiol Aging*. 2016; 39: 69-81. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.004>
27. Porquet D., Casadesús G., Bayod S., Vicente A., Canudas A., Vilaplana J., Pelegrí C., Sanfeliu C., Camins A., Pallàs M., del Valle J. Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age (Dordr)*. 2013; 35(5): 1851-65. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9489-4>
28. Varamini B., Sikalidis A., Bradford K. Resveratrol increases cerebral glycogen synthase kinase phosphorylation as well as protein levels of drebrin and transthyretin in mice: an exploratory study. *Int J Food Sci Nutr*. 2014; 65(1): 89-96. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.832171>
29. Yu K., Kwan P., Cheung S., Ho A., Baum L. Effects of Resveratrol and Morin on Insoluble Tau in Tau Transgenic Mice. *Transl Neurosci*. 2018; 9: 54-60. <https://doi.org/10.1515/tnsci-2018-0010>
30. Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Gong C. Contributions of protein phospho-



tases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(8): 1942-50. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x>

31. Brest P., Lapaquette P., Souidi M., Lebrigand K., Cesaro A., Vouret-Craviari V., Mari B., Barbry P., Mosnier J., Hébuterne X., Harel-Bellan A., Mograbi B., Darfeuille-Michaud A., Hofman P. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet.* 2011; 43(3): 242-5. <https://doi.org/10.1038/ng.762>

32. Schweiger S., Matthes F., Posey K., Kickstein E., Weber S., Hettich M., Pfurtscheller S., Ehninger D., Schneider R., Krauß S. Resveratrol induces dephosphorylation of Tau by interfering with the MID1-PP2A complex. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 13753. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12974-4>

33. Wood H. Alzheimer disease: Biomarkers of AD risk - the end of the road for

plasma amyloid- β ? *Nat Rev Neurol.* 2016; 12(11): 613. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.160>

34. Strang K., Golde T., Giasson B. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Lab Invest.* 2019; 99(7): 912-928. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0197-x>

35. Caillet-Boudin M., Buée L., Sergeant N., Lefebvre B. Regulation of human MAPT gene expression. *Mol Neurodegener.* 2015; 10: 28. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0025-8>

36. Forrest S., Lee S., Nassir N., Martinez-Valbuena I., Sackmann V., Li J., Ahmed A., Tartaglia M., Ittner L., Lang A., Uddin M., Kovacs G. Cell-specific MAPT gene expression is preserved in neuronal and glial tau cytopathologies in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 2023; 146(3): 395-414. <https://doi.org/10.1007/s00401-023-02604-x>

Информация об авторах / Information about the authors

Е.В. Чернышова – лаборант кафедры генетики цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Е.П. Крутских – инженер-биолог кафедры генетики цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

П.И. Бабенкова – студент кафедры генетики цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

В.В. Нестерова – студент кафедры генетики цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

И.Б. Певзнер – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функции митохондрий, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ, Москва, Россия

Е.Ю. Плотников – д.б.н., заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ, Москва, Россия

А.П. Гуреев – к.б.н., доцент кафедры генетики цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж; младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

E.V. Chernyshova – laboratory assistant at the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russia

E.P. Krutskikh – biological engineer, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russia

P.I. Babenkova – student of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russia

V.V. Nesterova – student of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russia

I.B. Pevzner – Ph.D. (Biol), Leading Researcher, Laboratory of Mitochondrial Structure and Function, A.N. Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

E.Yu. Plotnikov – Doctor of Science (Biol), Head of the Laboratory of Mitochondrial Structure and Function, A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

A.P. Gureev – Ph.D. (Biol), Associate Professor, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh; Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia

Статья поступила в редакцию 30.01.2024; одобрена после рецензирования 10.05.2024; принята к публикации 15.05.2024.

The article was submitted 30.01.2024; approved after reviewing 10.05.2024; accepted for publication 15.05.2024.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12244

Применение ионообменной хроматографии для очистки глиоксилатредуктазы из листьев кукурузы и исследование ее характеристик

Марина Олеговна Гатауллина, Александр Трофимович Епринцев

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru

Аннотация. Глиоксилатредуктаза (ГР, КФ 1.1.1.79) катализирует восстановление глиоксилата до гликолата с использованием никотинамидадениннуклеотидфосфата или никотинамидадениннуклеотида в качестве кофермента. Целью данного исследования было получение очищенного препарата исследуемого фермента из листьев кукурузы и изучение его характеристик.

В данной работе кинетические и регуляторные параметры глиоксилатредуктазы рассчитывались для листьев 14-дневных проростков кукурузы (*Zea mays*), выращенных гидропонным способом при 25°C. В процессе исследования были применены следующие методы: гомогенизация образцов, четырехэтапная очистка, включающая использование сульфата аммония для высаливания, гель-фильтрацию на колонках G-25 и ионообменную хроматографию с применением DEAE-SEPACEL, а также электрофорез на полиакриламидных гелях и количественное определение белка. Для изучения свойств фермента использовали электрофоретически гомогенные препараты. Влияние pH, концентрации субстрата и кофактора на скорость ферментативной реакции определяли серией измерений при различных значениях скорости ферментативной реакции.

В результате четырехстадийной очистки был получен гомогенный препарат с удельной активностью 167 Е/мг белка. Важную роль в очистке играла ионообменная хроматография, был получен 1 пик ферментной активности при десорбции в 104 мМ хлорида натрия. Исследование свойств глиоксилатредуктазы показало значительную зависимость активности от величины pH. Значение оптимального pH составило 6.5 единиц. Было показано, что значения K_m были определены методом Лайнуивера-Берка как 5.3 мМ для гликолата натрия, 0.15 мМ для НАД⁺ и 0.07 мМ для НАДФ⁺.

Исследования глиоксилатредуктазы, выделенной из листьев кукурузы, открывают хорошие перспективы для изучения роли этого фермента в адаптации метаболизма клетки к стрессовым условиям.

Ключевые слова: глиоксилатредуктаза, гликолат, НАД⁺, НАДФ⁺ *Zea mays*, ионообменная хроматография.
Для цитирования: Гатауллина М.О., Епринцев А.Т. Применение ионообменной хроматографии для очистки глиоксилатредуктазы из листьев кукурузы и исследование ее характеристик // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 426-431. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12244>

Original article

Using ion exchange chromatography for the purification of glyoxylate reductase from corn leaves and studying its characteristics

Marina O. Gataullina, Alexander T. Eprintsev

Voronezh State University, Voronezh, Russia, bc366@bio.vsu.ru

Abstract. The purpose of this study was to obtain a purified preparation of the studied enzyme from corn leaves and to study its characteristics. In this work, kinetic and regulatory parameters of glyoxylate reductase were calculated for leaves of 14-day-old corn (*Zea mays*) seedlings grown hydroponically at 25°C. The following methods were used during the study: sample homogenisation, four-step purification including ammonium sulphate for desalting, gel filtration on G-25 columns, and ion exchange chromatography using DEAE-



sephacel, as well as electrophoresis on polyacrylamide gels and quantitative analysis of protein. To study the properties of the enzyme, we used electrophoretically homogenous preparations. The influence of pH, substrate concentration, and cofactor on the rate of the enzymatic reaction was determined by a series of measurements with different values of the enzymatic reaction rate.

As a result of four-stage purification, we obtained a homogeneous preparation with a specific activity of 167 E/mg of protein. Ion exchange chromatography was important for purification; we obtained 1 peak of enzyme activity upon desorption in 104 mM sodium chloride. Studying the properties of glyoxylate reductase showed a significant dependence of activity on pH. The optimal pH value was 6.5 units.

It was shown that K_m values were determined by the Lineweaver–Burk method as 5.3 mM for sodium glycolate, 0.15 mM for NAD^+ , and 0.07 mM for $NADP^+$. Studies of glyoxylate reductase isolated from corn leaves are promising for studying the role of this enzyme in the adaptation of cell metabolism to stressful conditions.

Key words: glyoxylate reductase, glycolate, NAD^+ , $NADP^+$ *Zea mays*, ion exchange chromatography.

For citation: Gataullina M.O., Eprintsev A.T. Using ion exchange chromatography for the purification of glyoxylate reductase from corn leaves and studying its characteristics. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 426-431. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12244>

Введение

Одним из ферментов, отвечающих за формирование адаптаций растительной клетки к стрессовым условиям, является глиоксилатредуктаза. Глиоксилатредуктаза (ГР, КФ 1.1.1.79) – фермент класса оксидоредуктаз, который катализирует восстановление глиоксилата до гликолата. Коферментом ГР является никотинамидадениннуклеотидфосфат (НАДН) или никотинамидадениннуклеотид (НАДФН). Таким образом, исследуемый фермент ускоряет перенос гидрида от НАД(Ф)Н к глиоксилату. В ходе данных процессов происходит регенерация субстрата в гликолат и окисление кофактора до НАД(Ф)⁺ [1]. Глиоксилатредуктаза высококонсервативна и присутствует практически во всех организмах. Множество исследуемых глиоксилатредуктаз также катализируют превращение гидроксипирувата в D-глицерат [2].

Субстрат ГР, глиоксилат, является метаболитом при фотодыхании растений и синтезируется в пероксисомах [3], что обуславливает функции фермента. Глиоксилатредуктаза является челноком глиоксилата-гликолата, что помогает освободиться от избыточных восстановительных эквивалентов в результате фотосинтеза [4]. С другой стороны, накопление высоких концентраций гликолата может приводить к неблагоприятным последствиям для растений, таким как торможение метаболических процессов и

ухудшение ассимиляции CO_2 [5]. Кроме того, уровень активности глиоксилатредуктазы может использоваться как маркер стрессового воздействия для растений [6]. Целью данного исследования было получение очищенного препарата исследуемого фермента из листьев кукурузы и изучение его характеристик.

Экспериментальная часть

В работе использовали листья 14-дневных проростков *Zea mays L* (сорт Воронежская 76). Выращивание растений осуществлялось гидропонным способом при 10-ти часовом световом дне, температуре 25°C и интенсивности света 100 Ватт/м². Определение активности ГР производилось спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм по изменению оптической плотности реакционного фотометрического раствора. Реакционная смесь для определения скорости восстановления глиоксилата была приготовлена на основе 100 мМ Tris-HCl буфера с pH 6.5. В качестве субстрата использовался 20 мМ гликолат натрия, коферментом и кофактором выступали 0.6 мМ НАД(Ф)⁺ и 100 мМ хлорида калия соответственно.

Единицей ферментативной активности глиоксилатредуктазы считали такое количество фермента, которое восстанавливает 1 мкмоль НАД(Ф)⁺ за 1 мин при 25°C [7].

Последовательность из 4 этапов была использована для проведения процедуры

Таблица 1. Этапы очистки глиоксилатредуктазы из листьев кукурузы (n=3, p≤0.05)
Table 1. Steps for purifying glyoxylate reductase from corn leaves (n=3, p≤0.05)

Стадия	V, см ³	Белок, мг	Общая активность, Е.	Удельная активность, Е/мг белка	Выход%	Степень очистки
1) Гомогенат	11	25.8	150	0.88	100	1
2) Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	2.5	6.1	10.3	1.68	47	1.9
3) Гель-фильтрация через сефадекс G-25	7	5.5	11.8	2.10	54	2.4
4) Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-SEPHACEL	4	0.02	3.3	167	15	189

очистки. На первом этапе растительный материал был подвергнут гомогенизации [8]. Белки осаждали добавлением сульфата аммония при насыщении раствора 25-80%; для очистки фермента от связывающих солей и низкомолекулярных примесей использовали колонку (1.5×35 см), заполненную сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция). Получение фракции белка с глиоксилатредуктазной активностью производилось с применением ионообменной хроматографии на колонке (1.5×40 см) с DEAE Sephacel («GEHealthcare», Швеция). При элюировании применялся хлорид натрия с линейным градиентом в пределах от 0 до 150 мМ [9,10]. Содержание белка определяли по методу Лоури [11].

Полиакриламидный гель применялся в процессе электрофоретических исследований нативного фермента. Гомогенность препарата подтверждалась окрашиванием нитрата серебра, а специфичность фермента – тетразолиевым методом [8]. Аналитические определения для каждой из проб осуществлялись в трех повторностях. Статистическая обработка проводилась с применением критерия Стьюдента и поправки Бонферрони для учета множественных сравнений.

Обсуждение результатов

В ходе четырехстадийной очистки ГР из 14-х-дневных проростков кукурузы

был получен электрофоретически гомогенный препарат одной изоформы ГР. Степень очистки составила 189 раз; выход 15% (табл.1). Важным этапом процесса очистки было проведение высаливания с помощью сульфата аммония, при котором осаждение фермента производилось в диапазоне от 25 до 80% насыщения. При этом увеличивалась его концентрация и удельная активность. После этого следовал этап обессоливания с помощью колонки с сефадексом G-25. В результате проведенных процедур удалось освободить фермент от как низкомолекулярных примесей, так и от присутствующего сульфата аммония, который негативно влиял на его активность. Затем фермент был десорбирован с ДЭАЭ-SEPHACEL с использованием линейного градиента концентраций NaCl от 50 до 150 мМ в среде элюции.

Таким образом, в ходе элюции ГР из листьев кукурузы получили 1 пик ферментной активности при концентрации 104 мМ NaCl (рис. 1).

При электрофоретическом анализе в ПААГ фермент проявился по одной полосе ($R_f - 0.55$) при специфическом проявлении и универсальном окрашивании (рис. 2). Стоит отметить, что электрофореграммы с проявлением НАД⁺ и НАДФ⁺ в качестве кофакторов были одинаковы. pH среды влияет на активность ферментов, распределяя заряд внутри молекулы. Для большинства энзимов характерен определенный интервал pH, при котором

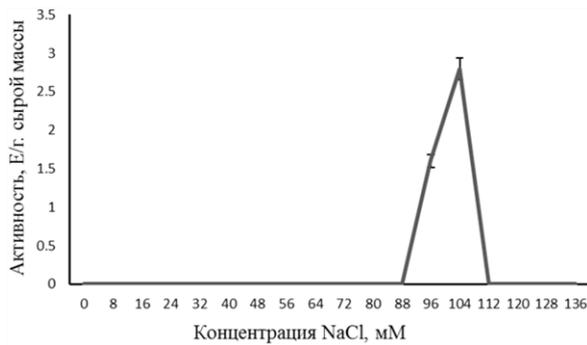


Рис. 1. Элюция глиоксилатредуктазы кукурузы при ионообменной хроматографии на DEAE Sephacel-колонке в градиенте 0-150 мМ хлорида натрия

Fig. 1. Elution of corn glyoxylate reductase by ion exchange chromatography on a DEAE Sephacel column in a gradient of 0-150 mM sodium chloride

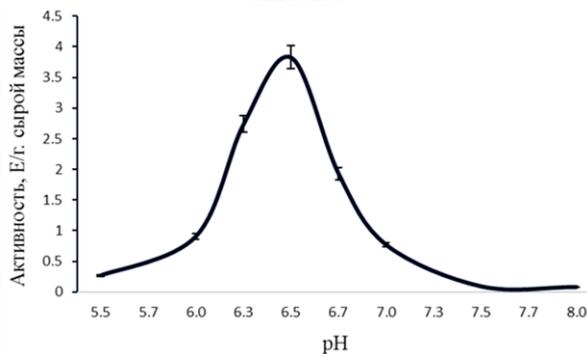


Рис. 3. pH-оптимум НАДФ⁺-глиоксилатредуктазы по реакции окисления гликолата натрия

Рис. 3. pH-оптимум НАДФ⁺-глиоксилатредуктазы по реакции окисления гликолата натрия

они могут работать. Полученное оптимальное значение pH-6.5 (рис. 3) согласуется с литературными данными, из которых известно, что оно находится в пределах от 6.5 до 7.5 [12].

Используя метод Лайнуивера-Берка, было проведено определение константы Михаэлиса для прямой и обратной реакций фермента.

Значение K_m по гликолату составило 5.3 мМ (рис. 4). Фермент показал более низкое сродство к НАД⁺ (0.15 мМ), чем к

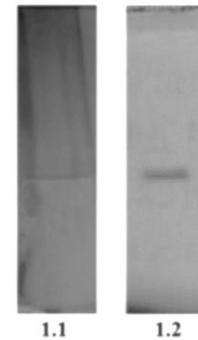


Рис. 2. Электрофореграмма глиоксилатредуктазы в ПААГ (1.1- проявление нитратом серебра; 1.2- окрашивание тетразолиевым методом).

Fig. 2. Electropherogram of glyoxylate reductase in PAGE (1.1. Development with silver nitrate; 1.2. Tetrazolium staining).

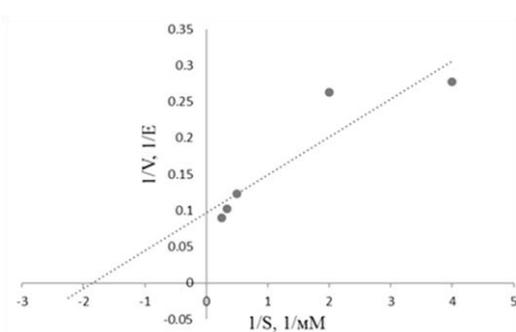


Рис. 4. Линеаризация зависимости активности глиоксилатредуктазы от концентрации гликолата в реакционной среде в координатах Лайнуивера-Берка
 Fig. 4. Linearisation of the dependence of glyoxylate reductase activity on the concentration of glycolate in the reaction medium in Lineweaver-Burk coordinates.

НАДФ⁺ (0.07 мМ) (рис. 5-6). Таким образом, предпочтительным кофактором для глиоксилатредуктазы из кукурузы, несмотря на способность использовать оба кофермента, является НАДФ⁺ [13,14].

Заключение

Гомогенный препарат с удельной активностью 167 был получен благодаря четырёхстадийной очистке. Очень важную роль в очистке играла ионообменная хроматография, был получен 1 пик ферментной активности при десорбции

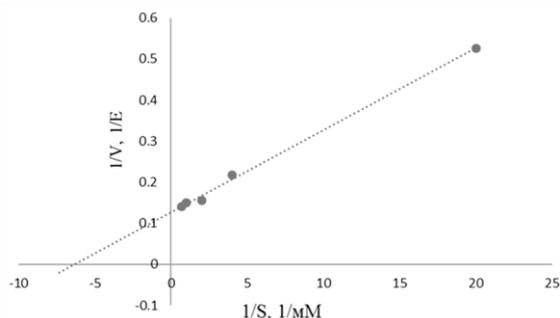


Рис. 5. Линеаризация зависимости активности глиоксилатредуктазы от концентрации НАД⁺ в реакционной среде в координатах Лайнуивера-Берка.

Fig. 5. Linearization of the dependence of glyoxylate reductase activity on the concentration of NAD⁺ in the reaction medium in Lineweaver-Burk coordinates

в 104 мМ хлорида калия. Исследование показало, что активность глиоксилатредуктазы значительно зависит от величины рН. Значение оптимального рН составило 6.5 единиц.

Для исследуемого гликолата натрия были получены следующие данные: значение K_m , определенное методом Лайнуивера-Берка, составило 5.3 мМ для гликолата натрия, 150 мкМ – для НАД⁺ и 70 мкМ – для НАДФ⁺.

Изучение глиоксилатредуктазы и ее роли в адаптации клеточного метабо-

Список литературы/References

1. Eisenhut M., Roell M.S., Weber A.P.M., Mechanistic understanding of photorespiration paves the way to a new green revolution. *New Phytol.*, 2019; 223(4): 1762-1769. <https://doi.org/10.1111/nph.15872>
2. Zemljanuhin A.A., Zemljanuhin L.A., Eprincev A.T., Igamberdiev A.U., Glioksilatnyj cikl rastenij. Voronezh: Izd-vo VGU, 1986, 148 p. (In Russ.)
3. Westhoff P, Gowik U., Evolution of C4 photosynthesis-looking for the master switch. *Plant Physiol.* 2010; 154(2): 598-601. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161729>
4. Kawai S., Mori S., Mukai T., Hashimoto W., Murata K., Molecular characterization of Escherichia coli NAD kinase. *Eur.*

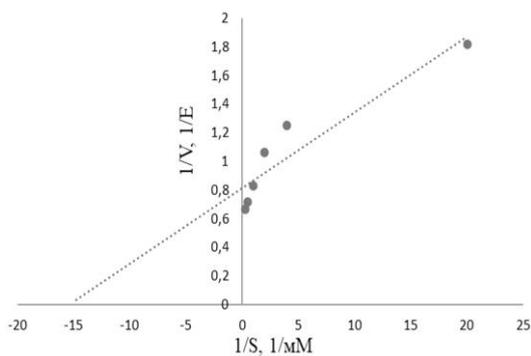


Рис. 6. Линеаризация зависимости активности глиоксилатредуктазы от концентрации НАДФ⁺ в реакционной среде в координатах Лайнуивера-Берка.

Fig. 6. Linearization of the dependence of glyoxylate reductase activity on the concentration of NADP⁺ in the reaction medium in Lineweaver-Burk coordinates

лизма к стрессовым условиям станет более понятным после глубоких исследований строения и функций молекулы глиоксилатредуктазы, выделенной из листьев кукурузы.

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.

J. Biochem. 2001; 268: 4359-4365. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02358.x>

5. Dello Y., Jossier M., Schmitz J., Maurino V. G., Hodges, M., Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism *Journal of Experimental Botany*, 2016; 67(10): 3041-3052. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw090>

6. Oberschall A., Deák M., Török K., Sass L., Vass I., Kovács I., Fehér A., Dudits D., Horváth G.V. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *The Plant Journal.* 2000; 24(4): 437-446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2000.00885.x>



7. Givan C. V., Kleczkowski L. A., The enzymatic reduction of glyoxylate and hydroxypyruvate in leaves of higher plants. *Plant Physiol.* 1992; 100: 552-556. <https://doi.org/10.1104/pp.100.2.552>
8. Gataullina M.O., Eprincev A.T., Vydelenie izoform NAD⁺-zavisimoy malatdehidrogenazy kukuruzy hromatograficheskimi metodami. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2018; 18(1): 111-117. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3475> (In Russ.)
9. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A., Fosfolipidy na fone prirodnyh matric. *Voronezh. Novaya kniga.* 2020. 318 p. (In Russ.)
10. Bondareva L.P., Astapov A.V., Selemenev V.F., Il'ina A.YU., Celektivnost' ionnogo obmena na iminokarboksil'noj smole i jenergija gidratacii ee ionnyh form. *ZHurnal fizicheskoy himii.* 2018; 92 (8): 1323-1328. <https://doi.org/10.7868/S0044453718080186>
11. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biologi.* 1951; 193: 265-275.
12. Hoover G.J., Prentice G.A., Merrill A.R., Shelp B.J. Kinetic mechanism of an Arabidopsis glyoxylate reductase: studies of initial velocity, dead-end inhibition and product inhibition. *Can. Bot.* 2007; 95:896-902. <https://doi.org/10.1139/B07-082>
13. Zhang Z., Liang X., Lu L., Xu Z., Huang J., He H., Peng X. Two glyoxylate reductase isoforms are functionally redundant but required under high photorespiration conditions in rice. *BMC Plant Biology.* 2020; 20(1):1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02568-0>.
14. Hoover G.J., Jørgensen R., Rochon A., Bajwa V.S., Merrill A.R., Shelp B.J. Identification of catalytically important amino acid residues for enzymatic reduction of glyoxylate in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 2013; 1834(12): 2663-2671. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.09.013>

Информация об авторах / Information about the authors

Гатауллина Марина Олеговна – ассистент, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел.(473)2208877

Епринцев Александр Трофимович – д.б.н., проф., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел. (473)2208877

Gataullina Marina O. – assistant, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail:marina.gataullina@gmail.com

Eprintsev Alexander T. – Doctor of Biology, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 15.01.2024; одобрена после рецензирования 10.05.2024; принята к публикации 15.05.2024.

The article was submitted 15.01.2024; approved after reviewing 10.05.2024; accepted for publication 15.05.2024.



ПИСЬМО В РЕДАКЦИЮ

Исправления в статье А.А. Никонова, Е.Ф. Рохина, О.Ю. Глызина, С.Д. Дылгерова, А.Н. Чиндявская, А.В. Рохин, А.Г. Пройдаков «Тонкослойная хроматография метилированных производных алкилбензолсульфонатов натрия в анализе воды методом ГХ-МС» (A.A. Nikonova, E.F. Rokhina, O.Yu. Glyzina, S.D. Dylgerova, A.N. Chindyavskaya, A.V. Rokhin, A.G. Proydakov «Thin layer chromatography of methylated derivatives of sodium alkylbenzenesulphonates in water analysis by GC-MS»), опубликованной в журнале «Сорбционные и хроматографические процессы». 2024. Т. 24, № 2. С. 268-280.

На странице 269 в англоязычном переводе аннотации найдены ошибки перевода в названии статьи, в имени первого автора, в аббревиатурах по тексту, в ключевых словах и в подписях к рисункам.

Неверный → верный варианты:

ASS → anionic surfactants;

SABS → LAS;

ME ABSA → LABSA ME;

alkylbenzenesulphonates → linear alkylbenzene sulfonates

Thin layer chromatography of methylated derivatives of sodium alkylbenzene sulfonates in water analysis by GC-MS

Alyona A. Nikonova^{1✉}, Elena F. Rokhina², Olga Yu. Glyzina¹, Svetlana D. Dylgerova^{1,2}, Anna N. Chindyavskaya^{1,3}, Alexander V. Rokhin², Alexey G. Proydakov²

¹Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, alenaxis@list.ru ✉

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Sodium or linear alkylbenzene sulfonates (LAS) are the most common anionic synthetic surfactants. They can cause both acute and chronic toxic effects on hydrobionts. Selective determination of sodium alkylbenzenesulphonates as a separate class of anionic surfactants is possible using gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) in the form of methyl esters of alkylbenzenesulfonic acids (LABSA ME). In order to purify the extracts and concentrate the analytes, we studied the behaviour of these compounds by ascending high-performance thin-layer chromatography (TLC) using Kieselgel 60 F254 and Sorbfil plates. A mixture of *n*-hexane and methanol solvents in a ratio of 23:1 (by volume) was used as the mobile phase. Under these conditions, sodium alkylbenzene sulfonates remain on the start line, while their derivatives (LABSA ME), obtained by methylation with trimethyl orthoformate in the presence of trifluoroacetic acid (with a yield of $\eta=98\%$), form zones characterised by retention coefficient values of $R_f = 0.62$ and $R_f = 0.71$ on Kieselgel 60 F254 and Sorbfil plates, respectively. The repeatability of the R_f values was characterised by a standard deviation of 6.1 and 5.9 %, respectively ($n=16$). The completeness of extraction (95.0-100.0 %) of analytes from the plates by descending TLC with acetonitrile was noted. The applicability of the TLC method for the concentration of analytes and pretreatment of extracts on the example of real water samples was shown. Using GC-MS with electron impact ionization, we determined the concentrations of LAS in water collected in the southern basin of Lake Baikal from a depth of 400 m ($0.24\pm 0.02 \mu\text{g}/\text{dm}^3$) and in snow water collected from the ice of the Krestovka River where it flows into Lake Baikal near the village of Listvyanka ($31.1\pm 1.0 \mu\text{g}/\text{dm}^3$).

Keywords: thin layer chromatography, TLC, silica gel, anionic surfactants, linear alkylbenzene sulfonates, LAS, methyl esters of alkylbenzenesulfonic acids, GC-MS, anionic surfactants in water, Lake Baikal.

Acknowledgments: the study received financing within the framework of state order of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 0279-2021-0005 “Study of the transformation of waterbodies and watercourses in Eastern Siberia...” using equipment of The Shared Research Facilities for Physical and Chemical Ultramicroanalysis LIN SB RAS on the basis of the Unique scientific Center “Experimental Freshwater Aquarium Complex of Lake Baikal water organisms” of Limnological Institute of SB RAS.

А.А. Никонова, Е.Ф. Рохина, О.Ю. Глызина,
С.Д. Дылгерова, А.Н. Чиндявская, А.В. Рохин, А.Г. Пройдаков

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
- **Knauer GmbH (Германия)** – препаративная и аналитическая хроматография
- **Nouryon (Швеция)** – сорбенты и колонки для хроматографии
- **A.I.T.France (Франция)** – оборудование для безопасной работы с растворителями

Увеличьте производительность пептидного и органического синтеза, используя микроволновые реакторы Initiator+. Для быстрой очистки полученных соединений используйте флеш-хроматографы Select. Высокоскоростные упариватели позволят вам получить готовое вещество из раствора за считанные минуты. Быстрота получения результатов, удобство работы и надежность оборудования – девиз компании Biotage.

Компания Chromacon с препаративной хроматографической системой Contichrom не имеет аналогов в мире. Она позволяет в непрерывном режиме MCSGP нарабатывать высокоочищенные субстанции, а в режиме N-Rich – примеси с производительностью и качеством, не достижимыми традиционными методами.

Препаративные хроматографические системы AZURA позволяют на одном приборе и разрабатывать, и масштабировать метод очистки за счет широкого диапазона скоростей потока и разнообразия используемых модулей в блоках Assistant.

Автоматизированное оборудование Biotage для подготовки проб позволит сделать рутинную работу легкой и займет совсем немного времени, а хроматографические сорбенты и ВЭЖХ-колонки Kromasil (Nouryon) незаменимы, если важна максимальная воспроизводимость от партии к партии как в контроле фармацевтических препаратов, так и в технологиях очистки.

Простое оборудование A.I.T.France обеспечит безопасную работу Вашего персонала с элюентами, содержащими токсические компоненты и растворители.

Цена свободная

*Подписка по каталогу «Почта России»,
подписной индекс ПН132*

*При перепечатке и цитировании
ссылка на «Сорбционные и хроматографические процессы»
обязательна*

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

*Авторы статей, опубликованных в данном журнале, декларируют отсутствие явных
и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией их статей*

Подписано в печать 10.07.2024. Формат 60×84 ½

Дата выхода в свет 06.08.2024

Усл. печ. л. 15,58. Тираж 50 экз. Заказ 148

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+