

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Научный журнал
Выходит 6 раз в год

Том 25, № 5, 2025

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, член-корреспондент РАН (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.П. Мешалкин, академик РАН, д-р техн.наук, проф. (РХТУ, Москва)

В.М. Мухин, д-р техн.наук, проф. (НПО «Неорганика», Электросталь)

Б.Ф. Мясоедов, академик РАН, д-р хим.наук, проф. (ИФЭХ РАН, Москва)

П.Н. Нестеренко, д-р хим.наук, проф. (МГУ, Москва)

И.А. Платонов, д-р техн.наук, проф. (СГАУ, Самара)

Т.Н. Попова, д-р биол.наук, проф. (Воронеж)

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

С.М. Староверов, д-р хим.наук (МГУ, Москва)

И.Г. Тананаев, член-корреспондент РАН, д-р хим.наук, проф. (ФИЦ КНЦ РАН, Апатиты)

Х.Т. Тробов, д-р хим.наук, проф. (СамГУ, Самарканд, Узбекистан)

Р.Х. Хамизов, член-корреспондент РАН (ГЕОХИ РАН, Москва)

В.Ю. Хохлов, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)

Х.С. Шихалиев, д-р хим.наук, проф. (Воронеж)

О.А. Шпигун, член-корреспондент РАН, д-р хим.наук, проф. (МГУ, Москва)

Ответственные секретари:

И.В. Воронюк, канд. хим.наук, доц. (Воронеж)

Л.Н. Коломиец, канд.хим.наук, Е.В. Рыбакова (ИФЭХ РАН, Москва)

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



©Воронежский государственный университет, 2025

SORBTSIONNYE I KHROMATOGRAFICHESKIE PROTSESSY (SORPTION AND CHROMATOGRAPHY PROCESSES)

Scientific journal
Published 6 times per year

Volume 25, No 5, 2025

ISSN 1680-0613

FOUNDER:

Voronezh State University

Journal was founded in December 2000

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

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

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

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

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

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

EDITOR-IN-CHIEF:

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

DEPUY-EDITORS-IN-CHIEF:

A.K. Buryak, corresponding member of the RAS
(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.P. Meshalkin, Academician of the RAS, Dr.Sc., Prof.
(MUCTR, Moscow)

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

B.F. Myasoedov, Academician of the RAS, Dr.Sc., Prof.

(IPEC RAS, Moscow)

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

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

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

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

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

I.G. Tananaev, corresponding member of the RAS, Dr.Sc., Prof.
(FRC KSC RAS, Apatity)

Kh.T. Trobov, Dr.Sc., Prof. (Samarkand State University,
Samarkand, Uzbekistan)

R.Kh. Khamizov, corresponding member of the RAS
(GEOKHI RAS, Moscow)

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

Kh.S. Shikaliev, 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., E.V. Rybakova (IPCE RAS, Moscow)

When reprinting the materials, a reference to the Sorbtionnye
i khromatograficheskie protsessy must be cited

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



© Voronezh State University, 2025

СОРБЦИОННЫЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

2025, Том 25, № 5



Выходит 6 раз в год

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Информация

**Карасев В.С., Андержанов Р.А.,
Кириянов А.Ю., Каламбет Ю.А.,
Зоров И.Н., Староверов С.М.,
Буряк А.К.**

Отечественный хроматограф низкого давления для разделения белков

Казакова В.Д., Нестеренко П.Н.

Закономерности удерживания полиолов на цеолите 13X в полярных органических растворителях

**Максимов Г.С., Дубинин И.А.,
Горбовская А.В., Пирогов А.В.,
Шпигун О.А., Чернобровкина А.В.**

Установление факторов влияния на селективность разделения карбоновых кислот на многофункциональном сорбенте на основе полистирол-дивинилбензола в смешанном режиме ВЭЖХ

**Смагина М.А., Хрисанфова А.О.,
Иванова Е.Д., Каринская Э.А.,
Статкус М.А., Шпигун О.А.,
Чернобровкина А.В.**

Закономерности удерживания неорганических ионов на аминированных неподвижных фазах на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола в среде с высоким содержанием ацетонитрила

Петракова С.Ю., Тихова В.Д.

Определение фтора во фторорганических соединениях методом ионной хроматографии сжигания

Большакова И.А., Ларенков А.А.

Выделение иттрия-90 на твердофазных экстрагентах для синтеза терапевтических радиофармацевтических препаратов

**Кружилин А.А., Дмитриев И.А.,
Потапов М.А., Шихалиев Х.С.**

Синтез и ВЭЖХ/МС-исследование производных 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидинола из растительных масел

650

651-663

664-674

675-686

687-696

697-704

705-714

715-722

Information

**Karasev V.S., Anderzhanov R.A.,
Kiryanov A.Yu., Kalambet Yu.A.,
Zorov I.N., Staroverov S.M.,
Buryak A.K.**

Low-pressure chromatograph for protein separation.

Kazakova V.D., Nesterenko P.N.

Patterns of polyol retention on zeolite 13X in polar organic solvents

**Maksimov G.S., Dubinin I.A.,
Gorbovskaia A.V., Pirogov A.V.,
Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V.**

Governing the separation selectivity of carbon acids on a novel poly(styrene-divinylbenzene)-based stationary phase in mixed-mode HPLC

**Smagina M.A., Khrisanfova A.O.,
Ivanova E.D., Karinskaia E.A.,
Statkus M.A., Shpigun O.A.,
Chernobrovkina A.V.**

Retention trends for inorganic ions on aminated silica and poly(styrene-divinylbenzene)-based stationary phases in acetonitrile-rich mobile phases

Petrakova S.Yu., Tikhova V.D.

Determination of fluorine in organofluorine compounds by combustion ion chromatography

Bolshakova I.A., Larenkov A.A.

Isolation of yttrium-90 on solid-phase extractants for the synthesis of therapeutic radiopharmaceuticals

**Kruzhilin A.A., Dmitriev I.A.,
Potapov M.A., Shikhaliev Kh.S.**

Synthesis and HPLC/MS Investigation of 2-Alkyl-5-Phenyl-4,5,6,7-Tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidinol Derivatives from Vegetable Oils.

<p>Испирян А.З., Сысueva С.В., Мыcина Ю.С., Бачинская Н.А., Нестеренко И.С. Раздельное определение содержания добавленных фосфатов методом ионной хроматографии</p> <p>Погоня Е.В., Горбовская А.В., Шпигун О.А., Ужель А.С. Новый анионообменник на основе сополимера стирола и дивинилбензола с привитым глицидилметакрилатом</p> <p>Тимичев А.А., Чичканова Е.С., Каплин А.В., Горбовская А.В., Пирогов А.В., Шпигун О.А., Ужель А.С. Анионообменник на полимерной основе с адсорбированным слоем оксида графена: аналитическая и термодинамическая характеристика</p> <p>Ершова А.Н., Стерлигова И.А. Анализ митохондриального фонда свободных жирных кислот растений <i>Zea mays</i> (L.) при действии фитогормона кинетина в разных условиях аэрации методом газожидкостной хроматографии</p> <p>Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Олейник С.А., Беспалов Д.Р. Применение хроматографических методов для очистки аконитатгидратазы из сердца крыс с патологией и исследование некоторых каталитических свойств фермента</p> <p>Бессонова Т.А., Колонский А.Е., Трубников Е.С., Коршунов Д.С., Дукат А.М., Гельфанд М.С., Тутукина М.Н. Очистка транскрипционного фактора YihW из пробиотического штамма <i>E. coli</i> Nissle 1917 с использованием аффинной хроматографии на спин-колон</p> <p>Анохина Г.Б., Плотникова Е.В., Епринцев А.Т. Метод конверсии ДНК бисульфитом натрия с сорбцией на оксид кремния</p> <p>Садовникова И.С., Бабенкова П.И., Буракова И.Ю., Сыромятников М.Ю., Гуреев А.П. Сравнение сорбционных методов выделения тотальной ДНК из мышечной ткани: влияние на выход и целостность митохондриальной ДНК</p>	<p>723-729</p> <p>730-738</p> <p>739-749</p> <p>750-758</p> <p>759-769</p> <p>770-781</p> <p>782-790</p> <p>791-799</p>	<p>Ispiryan A.Z., Sysueva S.V., Mysina Yu.S., Bachinskaya N.A., Nesterenko I.S. Separate determination of the content of added phosphates by ion chromatography</p> <p>Pogonia E.V., Gorbovskaia A.V., Shpigun O.A., Uzhel A.S. Novel anion exchanger based on poly(styrene-divinylbenzene) with grafted glycidyl methacrylate</p> <p>Timichev A.A., Chichkanova E.S., Kaplin A.V., Gorbovskaia A.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A., Uzhel A.S. Polymer-based anion exchanger with adsorbed graphene oxide layer: analytical and thermodynamic characterization.</p> <p>Ershova A.N., Sterligova I.A. Gas-liquid chromatography analysis of the mitochondrial pool of free fatty acids of <i>Zea mays</i> (L.) plants under the influence of kinetin phytohormone in different aeration conditions</p> <p>Kryl'skii E.D., Popova T.N., Oleynik S.A., Bepalov D.R. The application of chromatographic techniques for the purification of aconitate hydratase isolated from the hearts of rats with pathology, and the investigation of certain catalytic properties of this enzyme</p> <p>Bessonova T.A., Kolonskiy A.E., Trubnikov E.S., Korshunov D.S., Dukat A.M., Gelfand M.S., Tutukina M.N. Purification of the YihW Transcription Factor from the Probiotic <i>E. coli</i> Strain Nissle 1917 Using Affinity Chromatography on Spin Columns</p> <p>Anokhina G.B., Plotnikova E.V., Eprintsev A.T. Method for DNA conversion using sodium bisulfite with adsorption onto silica matrix</p> <p>Sadovnikova I.S., Babenkova P.I., Burakova I.Yu., Syromyatnikov M.Yu., Gureev A.P. Comparison of sorp-tion methods for total DNA isolation from muscle tissue: influence on the yield and integrity of mitochondrial DNA</p>
--	---	--

ИНФОРМАЦИЯ

25 июня 2025 года на базе Института Геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского прошел «Симпозиум по ионной хроматографии», организаторами которого выступили: Российская Академия наук; Объединенная комиссия по хроматографии научных Советов по физической и аналитической химии; Московский государственный университет; Институт Геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского. В работе этого симпозиума приняли участие ведущие отечественные ученые из Москвы, Санкт-Петербурга, Новосибирска, Воронежа, Белгорода.

Редакционная коллегия журнала «Сорбционные и хроматографические процессы» сочла необходимым опубликовать некоторые доклады в соавторстве с чл.-корр. РАН Буряком А.К., д.х.н. Нестеренко П.Н., д.х.н. Староверовым С.М., д.х.н. Дейнекой В.И., к.х.н. Ужель А.С., к.х.н. Чернобровкиной А.В., сделанные на Симпозиуме.

Доклады представлены авторами в виде статей и представляют по мнению редакции журнала большой интерес для исследователей, работающих в области ионообменной, ионной и ион-парной хроматографии.

ПОЗДРАВЛЕНИЕ



От имени редакции журнала «Сорбционные и хроматографические процессы» поздравляем члена редакционной коллегии, директора института геохимии и аналитической химии РАН, члена-корр. РАН Руслана Хажсетовича Хамизова с получением Премии Правительства Российской Федерации 2025 года в области науки и техники!

Искренние поздравления всему творческому коллективу под руководством академика Ю.А. Золотова!



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.112:543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13415

Отечественный хроматограф низкого давления для разделения белков

Виктор Семенович Карасев^{1,2}, Рушан Ахметович Андержанов¹,
Андрей Юрьевич Кирьянов², Юрий Анатольевич Каламбет^{1,3},
Иван Никитич Зоров⁴, Сергей Михайлович Староверов^{2,4}✉,
Алексей Константинович Буряк¹

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина РАН, Москва, Россия

²АО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия

³ООО «Амперсенд», Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, staroverov@bcmst.ru✉

Аннотация. Работа посвящена изучению возможностей нового отечественного лабораторного хроматографа низкого давления, предназначенного для разделения и препаративного выделения белков различными хроматографическими методами.

Оборудование обеспечивает работу в изократическом и градиентном режимах с использованием ультрафиолетового и кондуктометрического детекторов. Наличие встроенного коллектора фракций на базе переключающего крана позволяет собирать не только целевую фракцию, но и реализовать циклическую программу наработки вещества с промежуточной регенерацией хроматографической колонки. Ввод образца может быть осуществлен инжектором или через насос по отдельной линии. Управление оборудованием и регистрация полученных данных осуществляется отечественным программным комплексом «Мультихром Аксиома».

Проведенные исследования показали, что прибор позволяет реализовать все основные методы разделения белков: ионообменную, гидрофобную, аффинную и эксклюзионную хроматографию, продемонстрированы области использования оборудования в зависимости от вида хроматографического разделения и размеров используемых колонок.

Ключевые слова: хроматограф низкого давления, хроматография белков, ионообменная хроматография, гидрофобная хроматография, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография.

Благодарности: работа выполняется при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ по развитию отечественного научного приборостроения, шифр темы: «Хроматограф» (соглашение от 17 января 2024 г. №075-03-2024-414 с дополнительным соглашением от 31 июля 2024 г. # 075-03-2024-41412).

Для цитирования: Карасев В.С., Андержанов Р.А., Кирьянов А.Ю., Каламбет Ю.А., Зоров И.Н., Староверов С.М., Буряк А.К. Отечественный хроматограф низкого давления для разделения белков// *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 651-663. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13415>

Original article

Low-pressure chromatograph for protein separation

Victor S. Karasev^{1,2}, Rushan A. Anderzhanov¹, Andrey Yu. Kiryanov²,
Yuri A. Kalambet^{1,3}, Ivan N. Zorov⁴, Sergey M. Staroverov^{2,4}✉, Aleksey K. Buryak¹

¹Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Moscow, Russian Federation

²JSC BioChemMac ST, Moscow, Russian Federation, staroverov@bcmst.ru✉

³LLC Ampersand, Moscow, Russian Federation

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The paper is devoted to the study of the capabilities of a new domestic laboratory low-pressure chromatograph designed for the separation and preparative isolation of proteins by various chromatographic

methods. The equipment operates in isocratic and gradient modes using ultraviolet and conductometric detectors. A built-in fraction collector with a changing valve makes it possible both to collect a target fraction and to run a cyclic program for the production of the substance with intermediate regeneration of the chromatographic column. The sample can be either injected or pumped in using a separate line. The domestic software package Multichrom Axioma is used to control the equipment and to record data.

The conducted study showed that the device allows implementing all the main methods of protein separation: ion exchange, hydrophobic, affinity, and size-exclusion chromatography. The paper demonstrates the scope of use of the equipment depending on the type of chromatographic separation and the size of the used columns.

Keywords: low-pressure chromatograph, protein chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, size exclusion chromatography.

Acknowledgments: the work is carried out with the financial support of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation for the development of domestic scientific instrumentation, the cipher of the topic: Chromatograph (Agreement dated January 17, 2024 No. 075-03-2024-414 with additional agreement dated July 31, 2024 No. 075-03-2024-41412).

For citation: Karasev V.S., Anderzhanov R.A., Kiryanov A.Yu., Kalambet Yu.A., Zorov I.N., Staroverov S.M., Buryak A.K. Low-pressure chromatograph for protein separation. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 651-663. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13415>

Введение

Работа посвящена изучению возможностей нового отечественного лабораторного хроматографа низкого давления, предназначенного для разделения и препаративного выделения белков различными хроматографическими методами.

Оборудование обеспечивает работу в изократическом и градиентном режимах с использованием ультрафиолетового и кондуктометрического детекторов. Наличие встроенного коллектора фракций на базе переключающего крана позволяет собирать не только целевую фракцию, но и реализовать циклическую программу наработки вещества с промежуточной регенерацией хроматографической колонки. Ввод образца может быть осуществлен инжектором или через насос по отдельной линии. Управление оборудованием и регистрация полученных данных осуществляется отечественным программным комплексом «Мультихром Аксиома».

Экспериментальная часть

Растворители, реагенты и стандартные образцы. Экспериментальные исследования проводили с использованием следующих реактивов: фосфат натрия (Acros organics, Бельгия), Бис-Трис (Sigma, Австралия), ЭДТА (Panreac, Испания),

натрий лимоннокислый, кислота уксусная, хлорид натрия, сульфат аммония, гидроксид натрия, фосфорная кислота, соляная кислота, никель хлористый (ч.д.а., Россия), имидазол (для синтеза, Россия). Деионизированную воду получали с помощью системы водоподготовки Milli-Q (Millipore, США). Подвижные фазы и рабочие растворы готовили растворением необходимых навесок в деионизованной воде, с последующей фильтрацией через 0.2 мкм фильтр и дегазацией.

Оборудование. Взвешивания сухих реагентов проводили на весах “CAS MWP” (Cas corporation, Южная Корея). Для измерения pH использовали иономер «Эксперт-pH» (Эконикс Эксперт, Россия), для дозирования жидкостей использовали автоматические дозаторы 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (LABMATE, Польша). Для качественного анализа белковых смесей использовали электрофорез в денатурирующих условиях (ячейка Mini-PROTEAN Tetra, источник питания PowerPac Basic300V (Bio-Rad Laboratories, США). Для измерения электропроводности использовали кондуктометр «Эксперт-002» (Эконикс-Эксперт, Россия).

Разделение белков при низком давлении проводили с использованием макета

Таблица 1. Основные характеристики сорбентов

Table 1. Main characteristics of the sorbents

№	Наименование сорбента, носитель	Лиганд	Размер, мкм	Диапазон pH	Макс. давл., эксплуатации, бар
1	Protein A 6FF (Galak), агароза	Protein A	60 - 90	2-12	3
2	Ni NTA 6FF (Galak), агароза, 6%	Ni-NTA	90	3-12	5
3	Biokal Q SepFast HighRes Plus (Biokal), агароза+декстран	$N^+(CH_3)_3$	20 - 50	3-12	3
4	Helios 30 Q (LT Biotech), PS/DVB	$N^+(CH_3)_3$	30	2-12	40
5	Source 15Q (Cytiva), PS/DVB	$N^+(CH_3)_3$	15	2-12	40
6	Uni HR Butyl-30S, (Nanomicro), метакрилат	Butyl	35	2-12	8
7	Superdex 75 Prep, (Cytiva), агароза	-	47	3-12	4

хроматографической системы с условным названием Аксиома Дебют. В качестве сравнения при проведении ионообменной хроматографии белков использовали хроматографическую систему высокого давления АКТА Purifier (Cytiva, Швеция), включающую два насоса высокого давления P900, градиент-миксер на стороне высокого давления, фотометрический и кондуктометрический детекторы, узел ввода пробы и коллектор фракций. Сорбционные материалы и их характеристики представлены в таблице 1.

Аффинная хроматография. Аффинную хроматографию с сорбентом с иммобилизованным Protein A проводили в Tris-HCl буферных системах. Металл-хелатную на сорбенте с никелем - в фосфатных буферных системах, ступенчатое элюирование осуществляли с использованием растворов имидазола с концентрациями 20 и 400 мМ. Использовали колонки размером 7.3×25 мм объемом 1 см³. Скорости потока 1-2 см³/мин.

Ионообменная хроматография. Хроматографию проводили при стартовом pH 6.7 в 20 мМ буфере Бис-Трис/HCl, элюирование осуществляли в градиенте хлорида натрия от 0 до 400 мМ при потоках 1-2 см³/мин на колонках размером 7.3×25 мм объемом 1 см³ (носитель Helios 30 Q) и 10×100 мм объемом 8 см³ (носители Biokal Q и Source 15Q).

Гидрофобная хроматография. Хроматографию проводили на колонке размером 24×150 мм (65 см³) в условиях холодной комнаты при температуре 4-6°C. Стартовая концентрация сульфата аммония – 1.5М, pH 6,0. Элюирование осуществляли путем снижения содержания сульфата аммония ступенчатым градиентом при потоке 9 см³/мин.

Эксклюзионная хроматография. Эксклюзионную хроматографию проводили в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0 с добавлением 200 мМ NaCl на колонке размером 8×500 мм при потоке 0.4 см³/мин.

Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография. ВЭЖХ-анализ проводили на хроматографе Wellchrom (Кнауер, Германия) с детектированием при длине волны 220 нм и термостатированием при 30°C, петля 20 мкл. Использовали колонку 4×150 мм с сорбентом Диасфер 300-S4, 6 мкм. Поток – 1 см³/мин. Градиентное элюирование осуществляли с элюентами А (0.1% раствор трифторуксусной кислоты в воде) и В (0.1% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле) по следующей программе: 0-12 мин – 20-50%B; 12-16 мин – 50%B; 16-17 мин – 50-70%B; 17-20 мин – 70%B; 20-21 мин – 70-20%B; 21-30 мин – 20%B. Поток – 1 см³/мин.

Обсуждение результатов

Хроматографическая очистка природных и рекомбинантных белков является

важнейшей стадией при изучения биохимических и каталитических свойств ферментов, антител, функциональных полипептидов, при производстве современных высокоочищенных фармацевтических препаратов для таргетной терапии, производства диагностикумов, чистых белков для аналитического и технического применения.

Благодаря развитию биотехнологий, в последние годы в клинической практике используется все больше подобных лекарственных средств, включающих цитокины [1] (интерфероны, эритропоэтины, колониеобразующие факторы), гормоны [2, 3] (инсулины, соматотропин, группа половых гормонов), коагулянты, в том числе факторы свертывания крови [4], ингибиторы протеинкиназ, моноклональные антитела, вакцины, антибиотики и бактериофаги [5].

Белковая молекула, произведенная в чужеродной клетке-хозяине, может быть получена с примесями, в том числе с фрагментами ДНК клетки-хозяина, ее белками, полисахаридами и эндотоксинами. Применение препаратов с указанными контаминациями чревато серьезными осложнениями в области иммунопатологии [6]. Недостаточная чистота целевых белковых молекул может значительно снизить эффективность применения препарата при использовании в медицинской или технической сферах, или исказить результаты анализа при использовании белков или ферментов в составе диагностических или аналитических систем.

Практически во всех случаях требуется одна или несколько стадий очистки для достижения требований Фармакопеи по содержанию примесей, причем именно хроматографическая очистка, зачастую, обеспечивает быстрое и наиболее эффективное удаление нежелательных примесей с получением белкового препарата заданной чистоты. Это же относится и к препаратам, полученным из природных источников, например, из

плазмы крови. В случае получения свободного от вирусов, высокоочищенного иммуноглобулина, технология включает три стадии хроматографической очистки разными методами [7]. Выделение ферментов глюкозооксидазы и пероксидазы из культуральной жидкости соответствующих микроорганизмов в чистом виде, необходимых для количественного определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях включает 2-3 стадии хроматографического разделения [8]. Проведение направленной белковой инженерии ферментов невозможно без эффективных методов их выделения и изучения свойств [9].

Методы хроматографической очистки белков различаются по требованиям к химической природе сорбентов, их структурно-геометрическим характеристикам, а также условиям проведения процесса. В большинстве случаев используют сорбенты на основе мягких гелей, работающих при низких давлениях, что обеспечивает возможность использовать хроматографы низкого давления на основе перистальтических насосов. Важным моментом является устойчивость матрицы сорбента к щелочным значениям pH, которые применяются для отмывки сильно сорбируемых примесей и восстановления функциональности сорбента. Поэтому использование хроматографических матриц на полимерной или полисахаридной основе является приоритетным решением при проведении выделения белков из различных природных источников.

Разработанная хроматографическая система позволяет решить большинство задач, встречающихся в процессе очистки и выделения целевых белков, не прибегая к использованию более дорогих хроматографических систем высокого давления. В конструкции прибора и обслуживающего программного обеспечения на основе ПО Мультихром реализованы многолетний опыт и наработки коллектива разработчиков в области аналити

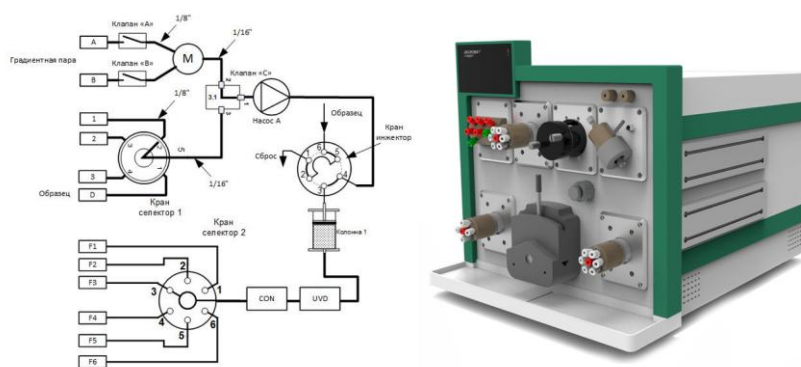


Рис.1. Гидравлическая схема и общий вид хроматографа
 Fig. 1. Hydraulic circuit and overview of the chromatograph

ческой и препаративной белковой хроматографии. На рис.1 представлен общий вид хроматографа и его гидравлическая схема.

Перистальтический насос низкой пульсации обеспечивает подачу элюента от 0.1 до 25 см³/мин (при промывках до 50 см³/мин) при давлении до 0.2 МПа. Градиентная пара создается клапанами, расположенными перед насосом, а переключающий кран предназначен для подачи образца (минуя камеру смешения) и от 3 до 5-ти различных буферных растворов при реализации сложных схем разделения в зависимости от количества портов в кране. Подачу образца можно осуществлять и через кран-инжектор. Такая схема позволяет увеличить функциональные возможности прибора для формирования градиентов при разделении сложных образцов или при автоматизации процесса рутинного разделения образцов по сравнению с известным и прекрасно зарекомендовавшим себя на рынке хроматографических систем низкого давления АКТА Start. По сравнению с известной системой расширен диапазон рабочих скоростей элюента (от 5 до 25 см³/мин) и в системе присутствует встроенный коллектор фракций на основе переключающего крана. Это позволяет увеличить производительность, используя колонки диаметром 24 мм (объем сорбента до 100 см³).

Детектирование осуществляется УФ-монитором при 280 нм, на основе светодиода, контроль проводимости регистрируется кондуктометром. Компоновка

прибора позволяет расширить возможности детектирования за счет установки дополнительного проточного рН-метра и/или УФ-детектора с переменной длиной волны, как на базе мануального фильтрового фотометра, так и с использованием спектрофотометрического детектора с изменяемой длиной в диапазоне 190-600 нм. Вес хроматографа 40 кг, габаритные размеры 650х650х650 мм.

Характеристики прибора обеспечивают использование колонок диаметром от 5 до 24 мм с размером частиц сорбента от 30 мкм и выше. Гидравлическая схема и программное обеспечение позволяют реализовать различные методы разделения белков, включая циклическую схему наработки целевого продукта с промежуточной регенерацией колонки в автоматическом режиме, что позволяет значительно повысить выходы целевого продукта без затрат на дорогостоящие сорбенты и колонки большого объема.

Хроматографическая система разработана в комплектации, максимально привязанной к запросам и задачам заказчика, с предварительно установленным и сконфигурированным ПО «МультиХром Аксиома». ПО основано на хорошо известной российской программе для хроматографии «МультиХром» [10] версии 4 и работает как в операционной среде Windows (версии 7, 10, 11), так и на компьютерах под управлением ОС Астра Линукс. К стандартным функциям ПО МультиХром добавлены управляющие модули,

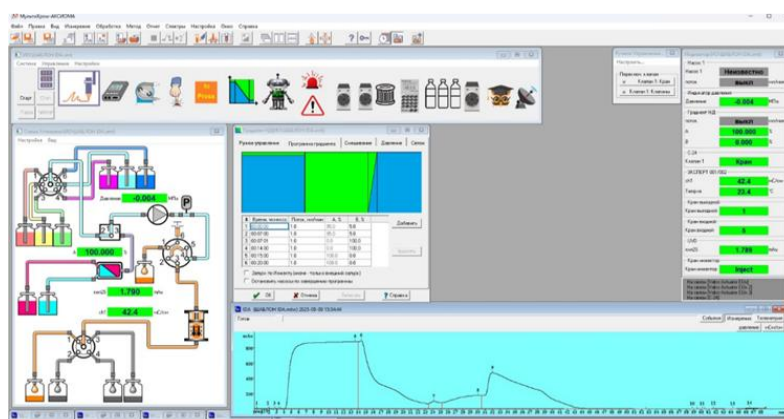


Рис.2. Вид рабочего пространства программного обеспечения
Fig. 2. Overview of the software workbench

специфические для препаративной белковой хроматографии: переключатели кранов и клапанов, управление детекторами и коллектором фракций, датчики аварий, схемы управления цифровыми линиями и насосами с ПИД регуляторами, преобразователи сигналов. Жидкостная схема хроматографа отображается на экране и онлайн визуализирует потоки элюента, положение кранов и клапанов, параметры хроматографической системы, показания детекторов, систем ввода образца и сбора фракций. Управление хроматографической системой возможно, как в программируемом, полностью автоматическом, так и в ручном режиме.

Функции ПО поддержаны платой управления хроматографа, в составе которой имеется три АЦП, семь вариантов цифровых выходов с частотной и широтно-импульсной модуляцией, входные/выходные каналы, счетные каналы, подключение дополнительных устройств по шине I2C. Такая конфигурация прибора дает широкие возможности для наращивания функционала, позволяет, в дальнейшем, проводить модернизацию и подключать дополнительные модули в зависимости от возникающих задач. В состав хроматографа входит информационная панель, на которую выводятся основные параметры хроматографической установки и некоторые элементы управления хроматографом (рис.2).

Программное обеспечение можно использовать не только для управления прибором и обработки результатов хроматографического анализа. Оно может быть настроено для выделения определенных компонентов на базе анализа параметров хроматографических пиков, так и для выделения целевого вещества в ходе многократного автоматического ввода и выполнения разделения с регенерацией колонки без непосредственного участия оператора. Детектор пиков срабатывает по комбинации уровня сигнала и/или производной, что позволяет разделять вещества при невысоком разрешении хроматографических пиков или разделять пики даже когда они не достигают уровня заданной базовой линии. Процесс можно приостановить, изменить параметры вручную и продолжить разделение, что удобно в процессах отработки параметров разделения и фракционирования. При работе ПО записываются протоколы действия пользователя, измеряемые сигналы и команды управления (след аудирования) для соответствия стандартам GLP.

ПО может быть гибко настроено на конкретное разделение, реакцию на выход параметров за допустимые пределы, прецизионную обработку полученных хроматограмм, выдачу отчетов в требуемом формате и другие функции. В базовом ПО «МультиХром» реализован ряд

уникальных технологий обработки данных, позволяющих поднять прецизионность и надежность хроматографического анализа [11-13].

Программное обеспечение «Мульти-Хром Аксиома» обеспечивает целостность данных, надежную идентификацию оператора, возможность смены оператора во время проведения процесса разделения белковой смеси или анализа. Есть поддержка валидационных процедур, включая валидацию системы (IQ/OQ/PQ), валидацию методик и самого ПО.

Аффинная хроматография белков

Наиболее специфичным методом, отличающим хроматографию белков от других хроматографических методов, является аффинная хроматография. Аффинная хроматография с использованием сорбентов с закрепленными на поверхности Белком А или Г является важнейшим этапом очистки моноклональных антител, на базе которых создаются новейшие эффективные лекарственные препараты направленного действия. В настоящей работе на модельной смеси иммуноглобулина G (IgG) и альбумина мы изучили возможность использования хроматографической системы с колонкой на основе Белка А, включая стабильность процесса при циклической наработке продукта.

Процесс выделения и очистки состоит из следующих основных стадий: уравнивание колонки, нанесение образца и его пропускание через сорбент с закрепленным Белком А, промывка сорбента для удаления слабо связанных с сорбентом компонентов, элюирование IgG с использованием буферов с различными физико-химическими свойствами для диссоциации антигена и антитела, элюирования прочих примесей и регенерация сорбента путем промывки его растворами с возвращением в исходное состояние для проведения следующего цикла выделения.

Хроматографию смеси IgG (1 мг/см³) и альбумина (5 мг/см³) проводили на ко-

лонке объемом 1 см³ (7.3x25 мм), заполненной сорбентом Protein A 6FF Galak (Китай). Образец в Элюенте А объемом 13 см³ наносили насосом со скоростью 1 см³/мин. С такой же скоростью проводили последующие хроматографические стадии и промывки. Использовали четыре буферных раствора следующего состава:

Элюент А: 20 mM Na₂HPO₄; 0.15M NaCl pH 7.4 – стартовый буфер

Элюент В: 0.1M глицин-HCl pH 2.5 – элюирование IgG

Элюент С: 0.1M NaOH – промывка от прочих сильно связавшихся примесей

Элюент D: вода – отмывка и подготовка к регенерации

Процесс осуществляли по следующей программе: 0-13 мин нанесение образца, 13-23 мин – Буфер А; 23-31 мин – Буфер В; 31-35 мин – Буфер D; 35-40 мин – Буфер С; 40-45 мин – Буфер D; 45-55 мин – Буфер А. Нанесение, очистку и сбор образца осуществляли в автоматизированном циклическом режиме, количество циклов 20, рис. 3.

Из хроматограмм на рис.3 видно, что результат разделения практически не изменяется в течение двадцати циклов процесса и целевой продукт по данным электрофореза полностью свободен от альбумина как после первого, так и после двадцатого цикла очистки. Следует отметить также, что с использованием циклического режима приблизительно за 20 часов удастся наработать 250 мг IgG на колонке объемом 1 см³. Иммуноглобулин выделяется узкой хроматографической зоной с концентрацией 5 мг/см³. Учитывая, что емкость сорбента составляет 35 мг/см³, на колонку можно наносить до 35 см³ исходного раствора IgG с концентрацией 1 мг/см³, что потенциально повышает производительность более, чем в два раза. Технические характеристики хроматографической системы позволяют использовать колонки объемом 100 см³ и более (колонки диаметром 24 мм), что

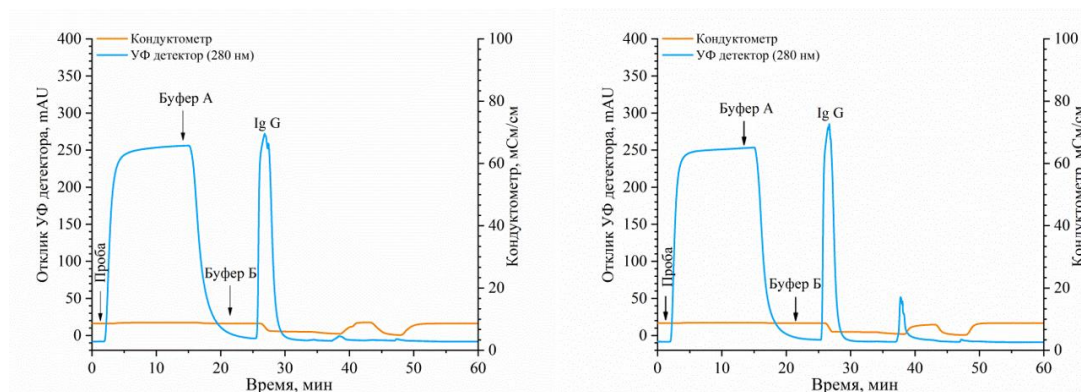


Рис.3. Хроматограммы выделения IgG на колонке Protein A 6FF объемом 1 см³. Слева 1-й цикл, справа – 20-й цикл

Fig. 3. Chromatograms of IgG isolation on the 1 ml Protein A 6FF column. 1st cycle (left), 20th cycle (right).

обеспечивает наработку значительных количеств IgG, достаточных не только для научных исследований, но и для получения пилотных партий высокоочищенных иммуноглобулинов.

Другой широко используемый метод аффинной хроматографии – это металл-хелатная хроматография. Для реализации метода биотехнологический процесс синтеза целевого белка проводят с использованием конструкции, обеспечивающей пришивку нескольких остатков гистидина (обычно 6 аминокислот) на С- или N-конце молекулы целевого белка. Такая полигистидиновая последовательность способна прочно связываться с ионами переходных металлов, например, никеля.

В качестве сорбента для связывания используют сефарозу или другой носитель с закрепленными лигандами иминодиуксусной (Ni-IDA) или нитрилотриуксусной (Ni-NTA) кислоты, которые эффективно связывают ионы никеля с образованием хелатного комплекса.

Процесс выделения и очистки состоит из следующих основных стадий: насыщения сорбента ионами никеля (при необходимости), промывки колонки для удаления избыточного раствора никеля, нанесения сырья, в процессе которого целевой белок, содержащий полигистидиновый фрагмент связывается с ионами никеля, образуя смешанный хелатный комплекс, промывки колонки для удаления

слабо связанных с поверхностью белков и других примесей, элюирования целевого белка с использованием буферного раствора, как правило, содержащего имидазол, который разрушает хелатный комплекс, регенерации сорбента путем промывки его буферными растворами и возвращение в исходное состояние.

Такой метод обеспечивает уже на первой стадии выделения достаточно высокую степень очистки и отделение от большинства примесей, мешающих эффективной хроматографии на следующих стадиях. В опыте использовали сульфатный осадок, полученный после разрушения биомассы с рекомбинантным соматотропином. 2 г осадка растворяли в 20 см³ элюента А, фильтровали последовательно через фильтры 20 мкм и 0.45 мкм. Образец объемом 13 см³ с концентрацией 2 мг/см³ наносили насосом со скоростью 1 см³/мин на колонку объемом 1 см³ (7.3 x 25 мм), заполненную сорбентом Ni-NTA 6FF Galak (Китай). С такой же скоростью проводили хроматографию. После нанесения образца колонку отмывали элюентом А, целевой белок элюировали элюентом В.

Элюент А: 20 mM натрий-фосфатный 0.5 M NaCl 30 mM имидазол, pH 8,2, 48 мСм/см

Элюент В: 20 mM натрий-фосфатный 0.5 M NaCl 0.3 M имидазол, pH 8.2, 49.9 мСм/см.

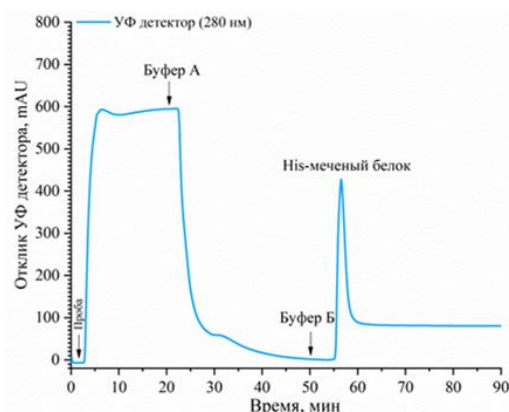


Рис.4. Металл-хелатная хроматография His-меченного белка.
Колонка 1 см³ с сорбентом Ni-NTA 6FF Galak
Fig. 4. Metal chelate chromatography of His-tagged protein.
1 ml column with a Ni-NTA 6FF Galak sorbent

На рис. 4 представлены результаты разделения His-меченного белка, которые демонстрируют эффективное извлечение целевого компонента из смеси. Белок выделяется узкой фракцией с концентрацией 5-7 мг/см³.

Таким образом, можно говорить об эффективном использовании хроматографа низкого давления для целей аффинной хроматографии как по селективности разделения, так и по нагрузкам. В таком процессе важнейшую роль играют характеристики сорбента и объем хроматографической колонки, а хроматограф низкого давления обеспечивает сопоставимый результат с хроматографическими системами высокого давления.

Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография широко применяется в процессах выделения и очистки белков. Ее используют как для предварительной очистки и концентрирования, так и на более поздних стадиях для тонкой очистки целевого вещества. Разрешающая способность процесса зависит также от характеристик сорбента. Нами проведены сравнительные исследования трех сорбентов различных производителей, характеристики которых представлены в таблице 1. Это сорбент Helios 30Q в колонке объемом 1 см³, сорбент Q SepFast HighRes Plus 10x90 мм

объемом 7 см³ и аналогичная колонка с сорбентом Source 15Q.

Изучение проводили на примере разделения лиофильно высушенной культуральной жидкости микроцета *Penicillium verruculosum* с клонированным геном β-ксилозидазы. Образец с предварительно обессоленной и переведенной в элюент А культуральной жидкостью с концентрацией 2 мг/см³ общего белка наносили на хроматографические колонки из расчета 10 мг белка на 1 см³ геля.

Элюент А: 10 мМ Бис-Трис/НСl, рН 6.7;

Элюент В: 10 мМ Бис-Трис/НСl + 0.4 М NaCl, рН 6.7.

Образец наносили в стартовом элюенте А, промывали до установления базовой линии, градиентное элюирование проводили от 0 до 225 мМ NaCl за 20 объемов колонки, затем проводили элюирование оставшихся белковых примесей ступенчатым подъемом концентрации NaCl до 400 мМ. Разделение на носителях Helios 30Q и Q SepFast HighRes Plus проводили с использованием разработанной хроматографической системы, а на носителе Source 15Q – системы AKTA Purifier 100 высокого давления. На рис. 5 представлены хроматографические профили разделения, полученные на хроматографических системах низкого и высокого

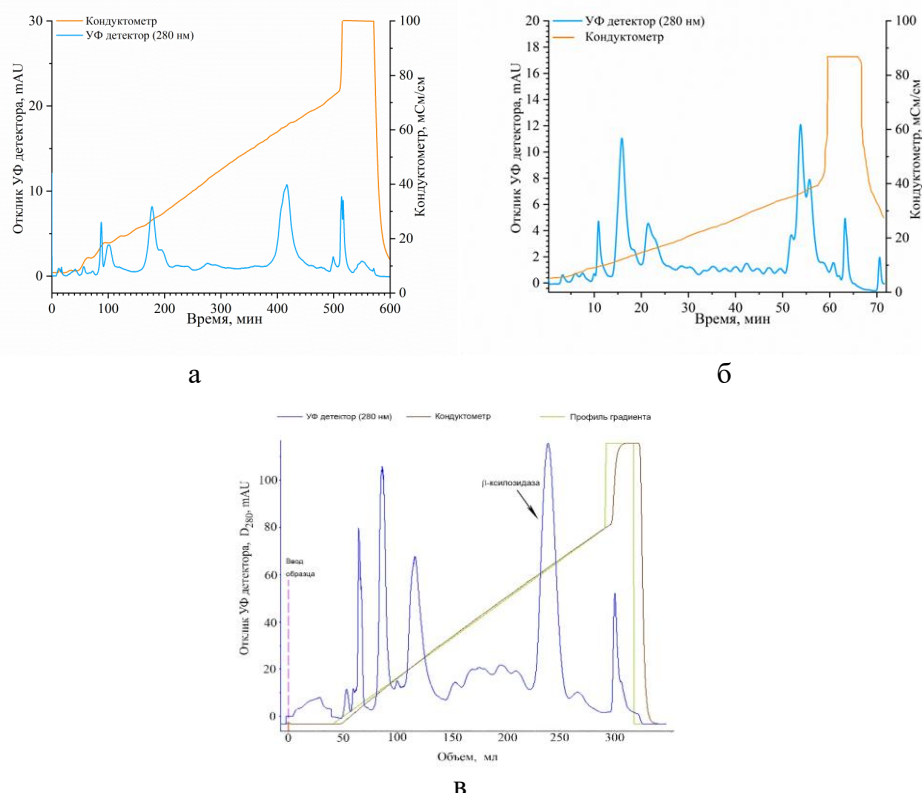


Рис. 5. Ионообменная хроматография культуральной жидкости *P. verruculosum* с клонированным геном β -ксилозидазы на колонке Biokal Q SepFast HighRes Plus CV 7 см³ (слева), Helios 30Q CV 1 см³ (в центре) и Source 15Q, 7 см³ (справа)

Fig. 5. Ion exchange chromatography of the *P. verruculosum* culture liquid with cloned β -xylosidase gene on the 7 ml Biokal Q SepFast HighRes Plus CV (left), 1 ml Helios 30Q CV (centre), and 7 ml Source 15Q (right) column

давления, в условиях, обеспечивающих наилучшее разрешение компонентов.

Из представленных результатов видна важность сравнительных исследований сорбентов однотипных по функциональной группе. Так на колонке с сорбентом Helios 30Q с частицами 30 мкм при работе при низком давлении за счет большей селективности сорбента получено лучшее разделение, чем на колонке с сорбентом Source 15Q с частицами 15 мкм, требующей использования высокого давления.

Гидрофобная хроматография

Гидрофобная хроматография как правило применяется на стадии тонкого разделения белков. В качестве примера использования мы провели разделение протеолитических проферментов трипсиногена и химотрипсиногена, полученных из экстракта эндокринного сырья после

предварительной очистки ионообменной хроматографией. Разделение в режиме гидрофобной хроматографии проводили на колонке размером 24 x 150 мм (68 см³) с гидрофобным сорбентом UniHR Butyl 30S. Процесс осуществляли в холодной комнате для демонстрации возможности работы прибора в условиях низких температур.

Раствор проферментов в цитратном буфере (0.02M со стадии ионного обмена) содержит 0.37M хлорида натрия. В раствор добавили 1.28M сульфата аммония до электропроводности 194 мСм/см (Буфер А). Хроматографию проводили в этом буфере до удаления основной примеси, затем элюировали трипсиноген буфером Б (Na-цитратный буфер с добавлением сульфата аммония до 104 мСм/см. После элюирования трипсиногена буфер

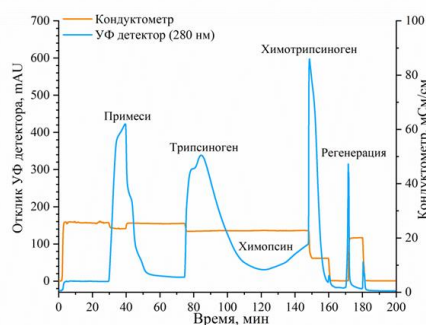


Рис. 6. Гидрофобная хроматография протеолитических проферментов на колонке 24x150 мм с сорбентом UniHR Butyl 30S, поток 9 см³/мин.

Fig. 6. Hydrophobic chromatography of proteolytic proenzymes on a 24x150 mm column with the UniHR Butyl 30S sorbent, flow rate: 9 ml/min

меняли на буфер С, содержащий цитрат натрия 0.02М с сульфатом аммония до 56 мСм/см и элюировали химотрипсиноген. ВЭЖХ анализ полученных фракций показывает, что метод позволяет выделить проферменты в индивидуальном виде с чистотой от 90 до 93% и нагрузкой 30-35 мг/см³ сорбента, что соответствует 2.5 г за один хроматографический цикл.

Гель-хроматография и обессоливание

Важными методами, используемыми на различных стадиях хроматографической очистки белков, являются процессы, основанные на разделении компонентов по их размерам. Такие подходы исключительно важны для удаления солей при подготовке к стадии ионного обмена (нагрузка до 30% от объема колонки), для группового разделения белков при нагрузках до 20% от объема колонки или для финишной очистки целевого белка с нагрузками на уровне 2%. Процесс финишной очистки может быть совмещен с заменой состава растворителя для подготовки конечной формы препарата.

Гель-хроматография высокого разрешения обычно реализуется на длинных колонках (20-50 см), заполненных сорбентами с частицами 10-15 мкм, что требует применения хроматографа среднего

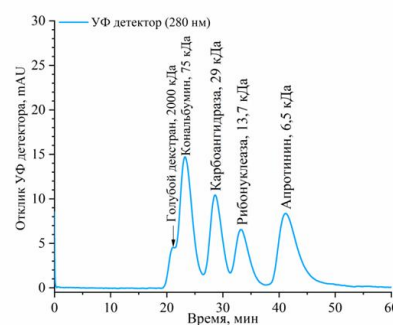


Рис. 7. Гель-хроматография хроматография белков на колонке 8x500 мм с сорбентом Superdex 75 Prep

Fig. 7. Gel chromatography of protein on an 8x500 mm column with the Superdex75 Prep sorbent.

или высокого давления. Однако и на хроматографе низкого давления можно получить представление о молекулярно-массовом распределении на сорбентах с зернением более 30 мкм.

На рис.7 представлена хроматограмма разделения белков с молекулярными массами от 6.5 до 75 кДа: кональбумин (75 kDa), карбоангидраза (29 kDa), рибонуклеаза (13.7 kDa) и апротинин (6.5 kDa). Хроматографический профиль демонстрирует достаточно высокую степень разрешения, что позволяет решать такие задачи, как оценка молекулярной массы или отделение димера белка от его мономера.

Заключение

Представленные результаты демонстрируют, что разработанный отечественный лабораторный хроматограф низкого давления позволяет реализовать все традиционные методы хроматографического выделения и очистки белков: аффинную, ионообменную, гидрофобную и гель-хроматографию, в том числе в условиях пониженной температуры.

Конструкция и гидравлическая схема прибора Аксиома Дебют в сочетании с программным обеспечением «Мульти-хром Аксиома» обеспечивает работу в ручном и автоматическом режимах, а

также позволяет реализовывать многократную циклическую процедуру очистки и выделения целевых белков для препаративной или рутинной наработки. Объем колонок может варьироваться в диапазоне двух порядков – от 1 до 100 см³, что вместе с возможностью реализации циклического процесса позволяет обеспечить наработку значительных количеств белка.

Использование разработанной хроматографической системы в сочетании с хроматографическими сорбентами с размером гранул около 30-100 мкм позво-

ляет эффективно, быстро и недорого проводить разделение целевых белков методами аффинной, ионообменной и гидрофобной хроматографии, а также проводить обессоливание и оценку молекулярных масс белков методом гель-проникающей хроматографии.

Конфликт интересов

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

743. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12512>.

8. Shin K.S, Youn H.D., Han Y.H., Kang S.O., Hah Y C. *Eur. J Biochem.* 1993; 215(3): 747-52.

9. Dotsenko A., Denisenko Ju., Zorov I. *J.Molec. Graph. and Model.* 2023; 119: 108381.

10. Kalambet Yu.A. Svidetel'stvo o gosudarstvennoj registracii programmy dlya E`VM: 2018616410. 2018. (In Russ.)

11. Kalambet Y.A., Kozmin Y.P., Perelroysen M.P. *J. Chromatogr. A*, 1991; 542: 247-261.

12. Kalambet Y.A. *J. Chemom.* 2011; 25(7): 352-356.

13. Kalambet Y.A., Kozmin Y.P. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssy.* 2024; 24(6): 944-955. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12571>

Список литературы/References

1. Razaghi A, Owens L, Heimann K. *J Bio-technol.* 2016; 240: 48-60.

2. Araki E, Araki H, Senokuchi T, Moto-shima H. *J Diabetes Investig.* 2020; 11(4): 795-797.

3. Richmond E., Rogol A. *Best Pract. Res Clin Endocrinol Metab.* 2016; 30(6): 749-755.

4. Raso S, Hermans C. *Drugs Today (Barc).* 2018; 54(4): 269-281.

5. Bogomolova E.G., Kopejkin P.M., Tagaev A.A. *Medicinskij akademicheskij zhurnal.* 2020; 20(3): 49-60. (In Russ.)

6. Schmetzer O., Moldenhauer G., Riesenberger R. *J. Immunol.* 2005; 174(2): 942-952.

7. Karasev, V.S., Bochkova, O.P., Staroverov, S.M., Ivanov, A.V., Pytskiy, I.S., Buryak, A.K. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssy.* 2024; 24(5): 735-

Информация об авторах / Information about the authors

В.С. Карасев – к.б.н., старший научный сотрудник Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина и АО «Биохиммак СТ», Москва, Россия

Р.А. Андержанов – инженер Института физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина, Москва, Россия

А.Ю. Кирьянов – научный сотрудник АО «Биохиммак СТ», Москва, Россия

Ю.А. Каламбет – к.ф.м.н., старший научный сотрудник Института физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина, генеральный директор ООО «Амперсанд», Москва, Россия

V.S. Karasev – Ph.Doc, (biology) Senior Researcher, Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin” and JSC “Biochemmack S&T”

R.A. Anderzhanov – Engineer, Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”

A.Yu. Kirianov – Research Associate, JSC “Biochemmack S&T”

Yu.A. Kalambet – Ph.Doc, (Physics and Mathematics), Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”; general director “Ampersand” LLC



И.Н. Зоров – к.х.н., ведущий научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

С.М. Староверов – д.х.н, заведующий лабораторией Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, президент АО «БиоХимМак СТ», Россия

А.К. Буряк – проф., д.х.н., член-корреспондент РАН, директор ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина, Москва, Россия

I.N. Zorov – Ph.Doc, (chemistry), Leading Researcher, Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

S.M. Staroverov – Dr.Sci. (Chemistry). Head of the laboratory of the Department of Chemistry M.V.Lomonosov Moscow State University; president of JSC “Biochemmack S&T” e-mail: staroverov@bcmst.ru

A.K. Buryak – Director of the Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”, Corresponding member of RAS. Moscow, e-mail: akburyak@mail.ru

Статья поступила в редакцию 02.05.2025; одобрена после рецензирования 30.10.2025; принята к публикации 02.11.2025.

The article was submitted 02.05.2025; approved after reviewing 30.10.2025; accepted for publication 02.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13416

Закономерности удерживания полиолов на цеолите 13X в полярных органических растворителях

Виктория Дмитриевна Казакова, Павел Николаевич Нестеренко[✉]

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
p.nesterenko@phys.chem.msu.ru[✉]

Аннотация. В работе рассмотрены закономерности удерживания полиолов на цеолите 13X в условиях ВЭЖХ с целью систематизации знаний относительно влияния структуры полиолов и условий разделения на удерживание сорбатов. Исследование продолжает изучение электростатически индуцированного ситового эффекта (ЭИСЭ), ранее обнаруженного для разделения одноатомных спиртов на цеолите 13X. Полученные результаты подтверждают присутствие ЭИСЭ при разделении полиолов на цеолите 13X. Удерживание полиолов на сорбенте возрастает по мере снижения содержания воды в подвижной фазе, что согласуется с принципами нормально-фазовой ВЭЖХ с водосовместимыми элюентами, известной также как хроматография гидрофильных взаимодействий (HILIC), однако наличие субнанопористой структуры с катионами Na^+ , обуславливающими появление ЭИСЭ, серьезно видоизменяют механизм удерживания. В случае полиолов возрастает роль положения гидроксильной группы в молекуле сорбата и вклада стерических факторов в удерживание. Сложный характер зависимости удерживания ($\log k'$) полиолов от гидрофобности сорбатов ($\log P$) обусловлен комбинацией различных факторов, включая геометрию пор, способность к специфическим электростатическим взаимодействиям и формированию водородных связей с группами на поверхности цеолита. В оптимальных условиях показана возможность разделения смеси низших полиолов и воды на цеолите 13X, что представляет интерес для препаративных разделений в промышленности. Также, полученные результаты позволяют обосновать возможность определения микроколичеств воды в полиолах с использованием цеолита 13X методом ВЭЖХ.

Ключевые слова: нормально фазовая хроматография, микропористые сорбенты, цеолит 13X, динамическая адсорбция полиолов, электростатически индуцированный ситовый эффект.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке научного гранта РНФ, проект 24-23-00161

Для цитирования: Казакова В.Д., Нестеренко П.Н. Закономерности удерживания полиолов на цеолите 13X в полярных органических растворителях // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 664-674. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13416>

Original article

Patterns of polyol retention on zeolite 13X in polar organic solvents

Viktoriia D. Kazakova, Pavel N. Nesterenko[✉]

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation, p.nesterenko@phys.chem.msu.ru[✉]

Abstract. The paper considers the patterns of polyol retention on zeolite 13X under HPLC conditions. Its purpose is to systematise our knowledge about the effect of the polyol structure and separation conditions on the retention of sorbates. The study continues to investigate the electrostatically-induced sieving effect (EISE) that had been discovered for the separation of monohydric alcohols on zeolite 13X. The obtained results confirm the presence of EISE during the separation of polyols on zeolite 13X. The retention of polyols on the sorbent increased with a decrease of the water content in the mobile phase, which is consistent with the principles of normal-phase HPLC with water-compatible eluents, also known as hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). However, the presence of a subnanoporous structure with Na^+ cations, which causes

the EISE, seriously modifies the retention mechanism. In the case of polyols, the role of the position of the hydroxyl group in the sorbate molecule and the contribution of steric factors to retention increase. The complex nature of the dependence of the polyol retention ($\log k'$) on the hydrophobicity of sorbates ($\log P$) is due to a combination of factors, including the pore geometry, the ability to undergo specific electrostatic interactions and form hydrogen bonds with groups on the surface of the zeolite. It was shown that there is a possibility to separate a mixture of lower polyols and water on zeolite 13X under optimal conditions, which is of interest for industrial preparative separation. Also, the obtained results make it possible to substantiate the possibility of using zeolite 13X to determine micro-quantities of water in polyols by HPLC.

Keywords: normal phase chromatography, microporous sorbents, zeolite 13X, dynamic adsorption of polyols, electrostatically induced sieving effect.

Acknowledgments. The research was supported by the Russian Science Foundation, project No. 24-23-00161.

For citation: Kazakova V.D., Nesterenko P.N. Patterns of polyol retention on zeolite 13X in polar organic solvents. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2025. 25(5): 664-674. (In Russ.).* <https://10.17308/sorpchrom.2025.25/13416>

Введение

ВЭЖХ широко используется для изучения адсорбционных свойств сорбционных материалов и является одним из наиболее распространенных методов разделения сложных смесей благодаря своей универсальности, высокой чувствительности и селективности [1]. Несмотря на огромное число сорбентов, используемых в качестве неподвижной фазы (НФ) в ВЭЖХ, поиск новых эффективных и селективных сорбентов является актуальной задачей. Особый интерес в последние годы привлекают микропористые сорбенты каркасного типа с фиксированным размером пор от 0.5 до 2.0 нм, такие как металлоорганические каркасы (МОК), координационные органические каркасы (КОК) и неорганические цеолиты [2, 3]. Отличительной чертой этих сорбентов, является высокая селективность, связанная с возможностью реализации высокоспецифичных эффектов, таких как квантовые ситовые эффекты [4, 5], квантовые ситовые эффекты химического сродства [6], а также проявление кинетической селективности и турбулентной хроматографии [7].

Особый интерес для ВЭЖХ представляют алюмосиликатные цеолиты. Высокая механическая прочность, термическая и гидролитическая устойчивость, способность к ионному обмену обуславливает их преимущество над МОК и КОК [2, 3]. Адсорбционные свойства цеолитов, связанные с микропористой структурой, кислотностью поверхностных групп

и просеивающими свойствами изучены достаточно подробно. Однако крайне мало известно о механизмах удерживания соединений в динамических условиях на цеолитах в жидкой фазе.

Недавно на основе анализа данных по удерживанию одноатомных спиртов на микропористом цеолите 13X в условиях ВЭЖХ был обнаружен электростатически-индуцированный ситовый эффект (ЭИСЭ), основанный на взаимодействии между гидроксильной группой *n*-алканолов и катионом натрия в порах цеолита 13X; что приводит к появлению высоко-селективной дискриминации молекул по размеру за счет конфигурационной диффузии внутрь пор [8]. В частности, реализация данного эффекта позволила осуществить селективное ($\alpha = k'_D/k'_H = 1.57$) разделение метанола и его полностью дейтерированного аналога (рис. 1). Интересно отметить, что открытый эффект является проявлением квантовых ситовых эффектов, широко известных лишь для диффузии молекул в газовой фазе. Можно предположить, что ЭИСЭ должен проявляться и для многоатомных спиртов и сахаров с большим количеством гидроксильных групп в молекулах.

Адсорбция полиолов на цеолитах из жидкой фазы изучена слабо. В работе по статической адсорбции полиолов из водной фазы полярным цеолитом NaY (Si/Al=7.3) отмечено более высокое сродство сорбента к этиленгликолю по сравнению с бутандиолом-1,2 [9]. Авторы

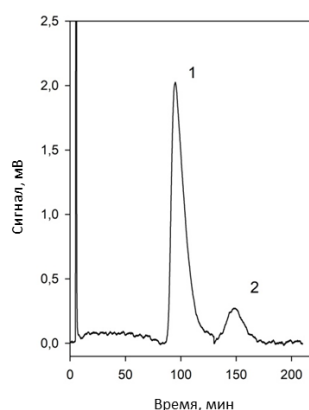


Рис. 1. Разделение смеси метанола (1) и дейтерометанола- d_4 (2). Колонка: 13X, 50x4.6 мм, 4 мкм. Элюент: ацетонитрил; скорость потока 0.1 см³/мин; 14 °С; рефрактометрический детектор.

Fig 1. Separation of a mixture of methanol (1) and deuteromethanol- d_4 (2). Column: 13X, 50x4.6 mm, 4 μ m. Eluent: acetonitrile; flow rate: 0.1 ml/min; 14 °C; refractometric detector.

связывают данный эффект с разницей в кинетических диаметрах этиленгликоля (0.4 нм) и бутандиола-1,2 (0.6 нм). Кроме того, этиленгликоль и бутандиол-1,2 адсорбируются по-разному на цеолите NaY — этиленгликоль вблизи атома натрия в структуре цеолита, в то время как бутандиол-1,2 предпочтительнее адсорбируется на w-центрах с образованием 12-членной структуры.

По данным ВЭЖХ [10] адсорбция полиолов на цеолите NaY (Si/Al = 2.4) в динамических условиях во многом определялась строением цеолита. Авторы считают, что пространственное расположение Na^+ -ионов внутри пор определяет взаимодействие с полифункциональными молекулами за счёт создания специфического электростатического поля и ограниченной подвижности молекул воды внутри пор. Катионы металлов координируют полиолы по ОН-группам [10].

Вышеупомянутые закономерности адсорбции полиолов на цеолитах в статических и, в особенности, динамических условиях, не противоречат принципам ЭИСЭ, обнаруженного для одноатомных спиртов на гидрофильном цеолите 13X в условиях ВЭЖХ [8]. Поэтому целью настоящей работы было изучение удерживания полиолов на цеолите 13X с акцентом на проявление эффекта ЭИСЭ.

Экспериментальная часть

В качестве элюентов использовали хроматографически чистый метанол или ацетонитрил (Merck, Германия). В качестве модельных сорбатов использовали этиленгликоль (Компонент-Реактив, Россия), 1,2-пропандиол и 1,3-пропандиол (Aldrich, Германия), 1,2-бутандиол, 1,3-бутандиол, 1,4-бутандиол (все Fluka, Германия) и 2,3-бутандиол (Acros organics, Бельгия), 1,2-пентандиол и 1,5-пентандиол (Clearsynth, India), 1,2-гександиол и 1,6-гександиол (Angene International, China), глицерин, этиритол, сорбитол, инозитол, арабиноза, манноза, фруктоза, глюкоза, ксилоза (Реахим, Россия).

В работе использовали хроматограф Кристалл ВЭЖХ 2014 (Хроматэк, Россия), состоящий из насоса высокого давления, дегазатора элюента, спектрофотометрического (СФД) и рефрактометрического (РД) детекторов. Термостатирование хроматографических колонок проводили с использованием жидкостного термостата ВТ-8 (Thermex, Россия). Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения Хроматэк Аналитик 3.1. Значения коэффициентов гидрофобности соединений ($\log P_{exp}$) взяты из программы EPI-WEB 4.1. Хроматографические колонки

длиной 50 или 100 мм и внутренним диаметром 4.6 мм заполняли суспензионным способом микропористым цеолитом 13X с диаметром частиц 4.0 или 5.0 мкм.

Измерение времен удерживания модельных сорбатов проводили при скорости потока подвижной фазы 0.1-1.0 см³/мин, объеме пробы 20 мкл, температуре от комнатной до 60°C. Время установления температурного равновесия контролировали по постоянству базовой линии РД.

Обсуждение результатов

Адсорбция полиолов на неполярных цеолитах. Закономерности адсорбции полиолов из жидкой фазы на неполярных цеолитах достаточно хорошо изучены в работах [11, 12]. Отмечается, что основной движущей силой адсорбции полиолов на гидрофобных цеолитах являются дисперсионные силы между адсорбатом и стенками пор цеолитов. Полиолы с большим количеством гидроксильных групп адсорбируются хуже, а положение гидроксильной группы в молекуле практически не влияет на адсорбцию. Увеличение полярности сорбента при уменьшении соотношения Si/Al в цеолите повышает адсорбционную емкость по полиолам [11, 13]. Структурные дефекты, приводящие к образованию силанольных групп, вносят значительный вклад в адсорбцию полиолов [11, 13]. При уменьшении размера пор цеолита адсорбция полиолов возрастает. В работе [12] отмечается сильное влияние присутствия воды в растворах, снижающее адсорбцию полиолов по сравнению с одноатомными спиртами с одинаковой длиной алкильной цепи за счет конкуренции ОН-групп за адсорбционные центры цеолита. Таким образом, по мнению авторов, при адсорбции полиолов на алюмосиликатных материалах необходимо учитывать вклад как кислотных центров Бренстеда, так и силанольных групп.

Адсорбция полиолов на Al₂O₃ из жидкой фазы. Ранее была отмечена ведущая

роль центров Льюиса с катионами металлов в удерживании одноатомных спиртов на полярном цеолите 13X [8]. Однако, из-за ограниченного числа работ по адсорбции полиолов на полярных цеолитах с низким соотношением Si/Al для оценки влияния различных центров на адсорбцию соединений этого класса можно использовать данные, полученные для гидратированного γ -Al₂O₃ - типичного представителя твердой кислоты Льюиса [14]. Показано, что адсорбция полиолов из водных растворов увеличивается с ростом числа гидроксильных групп в молекуле спирта, а расположение ОН-групп в молекуле полиола оказывает значительное влияние на адсорбцию. Глицерин с тремя ОН-группами лучше всего конкурирует с водой за адсорбционные центры γ -Al₂O₃, что подтверждается наиболее высокой адсорбцией среди полиолов. Авторы наблюдали два наиболее сильных поверхностных α - и γ -взаимодействия между двумя концевыми ОН-группами глицерина и оксидом алюминия, а центральная ОН-группа формировала водородную связь с поверхностью γ -Al₂O₃ (β -взаимодействие). Отсутствие центральной гидроксильной группы в пропандиоле-1,3 обуславливает более слабую адсорбцию по сравнению с глицерином. Конкурентная адсорбция между адсорбированной водой и полиолами (этиленгликолем, 1,2-пропандиолом) влияет на их поглощение из водных растворов на γ -Al₂O₃, а адсорбция глицерина и 1,3-пропандиола практически не зависит от количества воды, адсорбированной на Al₂O₃.

Удерживание полиолов на цеолите 13X. В работе [15] для цеолита 13X авторами были получены линейные корреляционные зависимости удерживания ($\log k'$) различных соединений в метаноле и ацетонитриле от их полярности по Снайдеру (P'). Однако, зависимость для n -алканолов имела характерную S-образный характер, более выраженный в ацетонитриле, что позволило обосновать ЭИСЭ. Следует отметить, что значения

P' измеряются экспериментально, и в литературе отсутствуют значения этого параметра для многих соединений, включая полиолы. Поэтому была построена зависимость (рис. 2) $\log k'$ от параметра гидрофобности $\log P_{\text{exp}}$, значения которого определены для многих органических соединений (табл. 1). Полученная для 38 соединений зависимость имеет вид гипер-

болы и демонстрирует снижение удерживания органических соединений с ростом гидрофобности, что характерно для НФ ВЭЖХ. Интересно отметить, что соединения с $\log P_{\text{exp}} \geq 1.0$ не удерживаются в метаноле и элюируются в мертвом объеме. Наиболее сильное удерживание отмечено для полиолов с длиной цепи $< C5$ (точки 34-43 на рис. 2).

Таблица 1. Значения $\log P_{\text{exp}}$ и $\log k'$ (метанол, 1.0 мл/мин) для модельных соединений на цеолите 13X в условиях ВЭЖХ.

Table 1. $\log P_{\text{exp}}$ and $\log k'$ (methanol, 1.0 ml/min) values for model compounds on zeolite 13X under HPLC conditions

№	Вещество	$\log P_{\text{exp}}$	$\log k'$	№	Вещество	$\log P_{\text{exp}}$	$\log k'$
1	<i>n</i> -гексан	4.15	-0.902	23	ДМСО	-1.35	-0.400
2	<i>n</i> -гептан	4.66	-0.875	24	вода	-1.38	0.728
3	толуол	2.73	-0.952	25	диэтилкетон	0.99	-1.000
4	<i>n</i> -ксилол	3.15	-0.997	26	метилбутилкетон	1.38	-1.036
5	бензол	0.89	-1.035	27	<i>n</i> -гептанол	2.62	-1.086
6	диэтиловый эфир	0.89	-0.930	28	<i>n</i> -нонанол	3.77	-1.086
7	дихлорметан	1.25	-0.911	29	<i>n</i> -додеканол	5.13	-1.097
8	<i>n</i> -гексано́л	2.03	-1.078	30	1,2-гександиол	0,69 ^a	1,20
9	<i>n</i> -пентано́л	1.19	-1.122	31	1,6-гександиол	0,77 ^a	0,991
10	<i>n</i> -пентано́л	1.51	-1.036	32	1,2-пентандиол	0,20 ^a	1.190
11	<i>изо</i> -бутано́л	0.76	-1.000	33	1,5-пентандиол	0,27 ^a	0,94
12	<i>n</i> -бутано́л	0.88	-0.597	34	1,2-бутандиол	-0.29 ^a	-0.128
13	<i>и</i> -пропа́нол	0.05	-0.813	35	1,3-бутандиол	-0.29 ^a	-0.123
14	<i>n</i> -пропа́нол	0.25	-0.576	36	2,3-бутандиол	-0.92	-0.093
15	эта́нол	-0.31	-0.531	37	1,4-бутандиол	-0.83	-0.087
16	метилэтилкетон	0.29	-0.737	38	1,2-пропандиол	-0.92	0.025
17	1,4-диокса́н	-0.27	-0.556	39	1,3-пропандиол	-1.04	0.067
18	а́цетон	-0.24	-0.571	40	этиленглико́ль	-1.36	0.615
20	а́цетонитри́л	-0.34	-0.160	41	глице́рин	-1.76	1.625
21	ни́трометан	-0.35	0.069	42	э́ритритол	-2.29	2.263 ^б
22	ДМФА	-1.01	-0.349	43	сорби́тол	-2.47	2.754 ^б

^a – приведены расчетные значения $\log P_{\text{calc}}$;

^б – аппроксимированные значения ввиду сильного роста удерживания адсорбата с уменьшением содержания воды в элюенте.

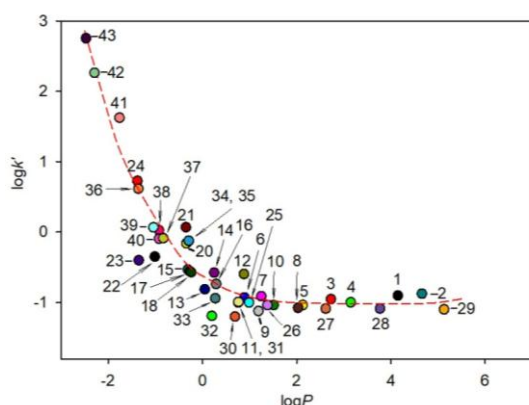


Рис. 2. Зависимость $\log k'$ модельных соединений на цеолите 13X от $\log P_{\text{exp}}$. Элюент метанол, 35°C. Номера соответствуют обозначению соединений в таблице 1.

Fig 2. Dependence of $\log k'$ model compounds on zeolite 13X on $\log P_{\text{exp}}$. Eluent: methanol, 35 °C. The numbers correspond to the designations of the compounds in Table 1.

В целом, нелинейная зависимость говорит о сложном механизме удерживания сорбатов, где учитывается не только гидрофильность соединения, но и способность к образованию специфических взаимодействий с адсорбционными центрами, а также, соотношение размера пор цеолита и кинетического диаметра молекул. Например, отклонение от полученной зависимости отмечено для относительно слабо удерживаемых диметилформамида (ДМФА) и диметилсульфоксида (ДМСО) (22 и 23) и относительно сильно удерживаемых ацетонитрила и нитрометана (20 и 21).

При использовании ацетонитрила в качестве элюента удерживание полиолов на цеолите 13X оказалось чрезвычайно сильным, что связано со слабой способностью этого растворителя образовывать водородные связи [8, 10]. Зависимости, полученные для полиолов в метаноле, показывают корреляцию удерживания с длиной углеводородного радикала адсорбата (рис. 3), что характерно для ЭИСЭ, наблюдаемого для одноатомных спиртов [8].

Кинетические эффекты. Для диолов, в особенности, для бутандиолов, в отличие от одноатомных спиртов, с уменьшением

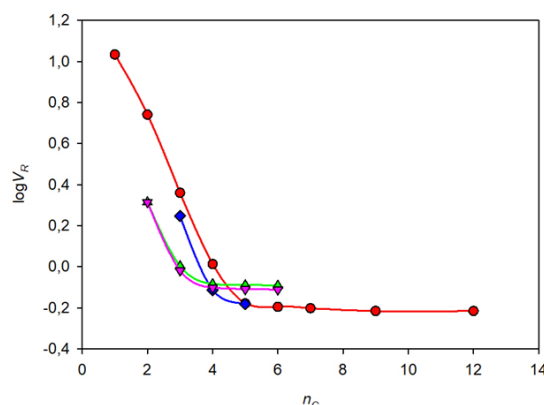


Рис. 3. $\log V_R$ от n_C для n -спиртов (●), изо-спиртов (◇) (элюент – ацетонитрил) и диолов (элюент – метанол) (▲ – терминальные; ▼ – 1,2-диолы), скорость потока

0.5 $\text{cm}^3/\text{мин}$. Колонка: 13X, 50x4.6 мм, 5 мкм
Fig. 3. $\log V_R$ on n_C for n -alcohols (●), isoalcohols (◇) (eluent: acetonitrile) and diols (eluent: methanol) (▲ – terminal; ▼ – 1,2-diols); flow rate: 0.5 ml/min. Column: 13X, 50x4.6 mm, 5 μm

скорости потока наблюдается рост объема удерживания ($\log V_R$), что хорошо согласуется с представлениями о кинетической селективности в микропористых сорбентах [7], которая объясняется более глубоким проникновением молекул адсорбата в поры адсорбента при уменьшении линейной скорости элюента (рис. 4). В данной работе такой эффект был наиболее ярко выражен для бутандиолов при объемной скорости меньше 0.3 $\text{cm}^3/\text{мин}$. Близкие размеры молекул бутандиола-1,2 (кинетический диаметр 0.60 нм), бутандиола-2,3 (0.68 нм) [9, 16] и диаметра пор цеолита 13X ($D_{\text{пор}} = 0.74$ нм) позволяют предположить наличие эффектов кинетической селективности при разделении этих соединений.

Тепловые эффекты адсорбции диолов.

Для понимания механизма адсорбции полиолов на цеолите 13X из уравнения Вант-Гоффа (1) были рассчитаны значения относительных теплот адсорбции: энтальпии ($-\Delta H^{00}$) и энтропии ($-\Delta S^0 + \varphi \cdot R$):

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

где φ – фазовое соотношение, постоянное для отдельно взятой колонки. В работе

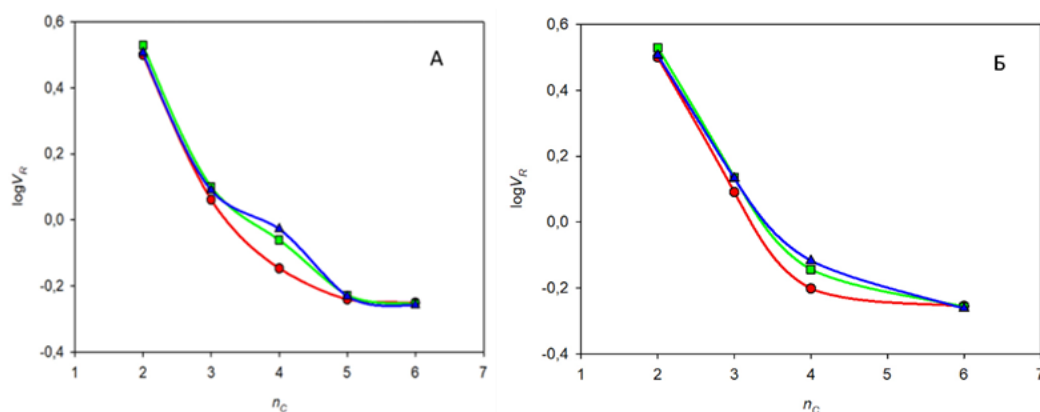


Рис. 4. $\log V_R$ от n_C для α,ω -замещенных диолов (А) и 1,2-диолов (Б) при скорости потока $0.3 \text{ cm}^3/\text{мин}$ (●), $0.2 \text{ cm}^3/\text{мин}$ (■), $0.1 \text{ cm}^3/\text{мин}$ (▲). Колонка: 13X, $50 \times 4.6 \text{ мм}$, 4 мкм .

Fig. 4. $\log V_R$ on n_C for α,ω -substituted diols (A) and 1,2-diols (B) at a flow rate of 0.3 ml/min (●), 0.2 ml/min (■), 0.1 ml/min (▲). Column: 13X, $50 \times 4.6 \text{ mm}$, $4 \text{ }\mu\text{m}$.

Таблица 2. Рассчитанные значения кажущихся теплот адсорбции одноатомных спиртов из ацетонитрила и полиолов из метанола на цеолите 13X.

Table 2. The calculated values of the apparent heat of adsorption of monohydric alcohols from acetonitrile and polyols from methanol on zeolite 13X.

Соединение	$-\Delta H^{oo}$, кДж/моль	$-(\Delta S^o + \varphi^* R)$, Дж/(моль * K)
Бутандиол-1,2	15.05 ± 0.5	51.0 ± 0.3
Бутандиол-1,3	15.73 ± 0.4	53.4 ± 0.2
Бутандиол-2,3	13.28 ± 0.3	44.8 ± 0.2
Бутандиол-1,4	15.86 ± 0.2	54.0 ± 0.2
Пропандиол-1,2	2.3 ± 0.1	6.8 ± 0.1
Пропандиол-1,3	3.7 ± 0.3	10.4 ± 0.2
Этиленгликоль	5.38 ± 0.05	6.61 ± 0.01
<i>n</i> -бутанол ^В	11.05 ± 0.02	41.76 ± 0.02
<i>n</i> -пропанол ^В	18.83 ± 0.03	55.47 ± 0.01
Этанол ^В	19.85 ± 0.01	48.75 ± 0.01
Метанол ^В	19.94 ± 0.02	41.48 ± 0.02

^В – данные взяты из работы [8].

соблюдали условия применимости уравнения Вант-Гоффа в ВЭЖХ, сформулированные в работе [17].

Значения $-\Delta H^{oo}$ уменьшаются от этиленгликоля к пропандиолам аналогично ранее полученным данным для *n*-алканолов [8], и возрастают для бутандиолов (табл. 2), что может быть связано со стерическими препятствиями для диффузии более крупных молекул внутрь пор цеолита 13X. Авторы работы [9] отметили, что с ростом температуры плотность упаковки молекул бутандиола-1,2 в порах цеолита NaY, влияющая на $-(\Delta S^o)$, возрастает по сравнению с этиленгликолем.

Хотя энергия адсорбции 1,2-бутандиола на цеолите NaY выше энергии адсорбции этиленгликоля, но из-за более плотной упаковки молекул этиленгликоля в порах, относительно меньшее число молекул 1,2-бутандиола взаимодействуют с внутренней поверхностью пор. Литературные данные [8] хорошо согласуются с результатами данной работы. Наименьшие значения $-\Delta H^{oo}$ среди бутандиолов наблюдали для 2,3-бутандиола, что связано с ограничениями на вращения его молекулы из-за наличия двух OH-групп у соседних атомов углерода [18]. Изменение ΔH^{oo} отвечает за изменение энергии,

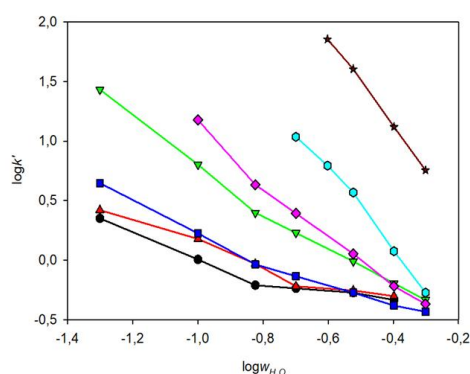


Рис. 5. Зависимость удерживания ($\log k'$) полиолов от содержания воды в ацетонитриле. Полиолы: 1,3-пропандиол (●), 1,2-пропанол (▲), этиленгликоль (■), глицерин (▼), эритритол (◇), сорбитол (●), инозитол (★). Скорость потока 1 см³/мин, 35°C.

Fig 5. Dependence of the polyol retention ($\log k'$) on the water content in acetonitrile. Polyols: 1,3-propanediol (●), 1,2-propanol (▲), ethylene glycol (■), glycerol (▼), erythritol (◇), sorbitol (●), and inositol (★).

Flow rate: 1 ml/min, 35°C

возникающее в результате взаимодействия адсорбата с цеолитом, а изменение ΔS° связано с пространственным расположением молекул и пор цеолита. Близость размеров молекул бутандиолов и пор цеолита заставляет молекулы проникать в поры впри-тирку, что сопровождается эффектом эн-тальпийно-энтропийной компенсации [19]. Таким образом, расположение гидроксиль-ных групп в полиолах оказывает сильное влияние на их удерживание.

Влияние состава фазы на удерживание полиолов. Считается [10], что фактором, определяющим удерживание полиолов в хроматографии гидрофильных взаимо-действий (HILIC) на цеолитах является относительное расположение катионов Na^+ , которые создают электростатиче-ские поле в порах и координируют моле-кулы воды и полиолов по гидроксильным группам. В работе показано, что с ростом количества ОН-групп удерживание по-лио-лов на колонке, заполненной цео-литом NaY, возрастает. Также, удержи-вание полиолов увеличивается по мере сни-жения содержания воды в элюенте [10].

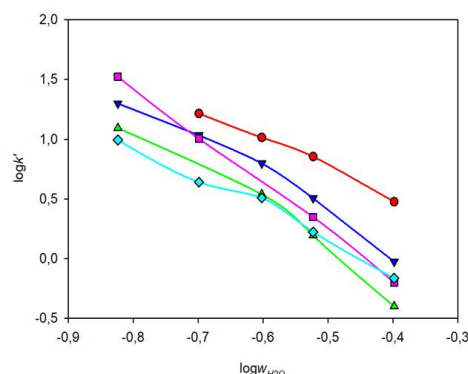


Рис. 6. Зависимость удерживания ($\log k'$) сахаров от состава содержания воды в аце-тонитриле. Полиолы: арабиноза (●), ман-ноза (▲), фруктоза (▼), глюкоза (■), кси-лоза (◇). Скорость потока 1 см³/мин, 35°C.

Fig 6. Dependence of the sugar retention ($\log k'$) on the water content in acetonitrile. Polyols: arabinose (●), mannose (▲), fructose (▼), glucose (■), and xylose (◇). Flow rate: 1 ml/min, 35°C.

Данное наблюдение было проверено в настоящей работе для более полярного цеолита 13X. Из рис. 5 видно, что с ростом содержания ацетонитрила в элюенте удержи-вание полиолов на цеолите 13X возраст-т аналогично результатам, полученным для NaY [5], и закономерностям HILIC. Кроме того, как и в работе [10], графики зависимости $\log k'$ полиолов от содержания воды в элюенте ($\log w_{\text{H}_2\text{O}}$) практически ли-нейны и описываются уравнением Снай-дера-Сочевинского [20]):

$$\log k' = \log k'_0 - n \times \log w_{\text{H}_2\text{O}} \quad (2)$$

где n – количество молекул сильноудер-живаемого компонента подвижной фазы, вытесняемое одной молекулой сорбата с поверхности адсорбента (как правило, $1 < n < 2$). В данной работе значение n варь-ровалось от 0.73 для 1,3-пропандиола до 3.69 для инозитола.

Удерживание сахаров. В случае саха-ров можно ожидать высокую селектив-ность разделения, поскольку для близких по размеру молекул, диполи которых ста-тичны из-за стерических препятствий при диффузии в поры цеолита, роль катиона

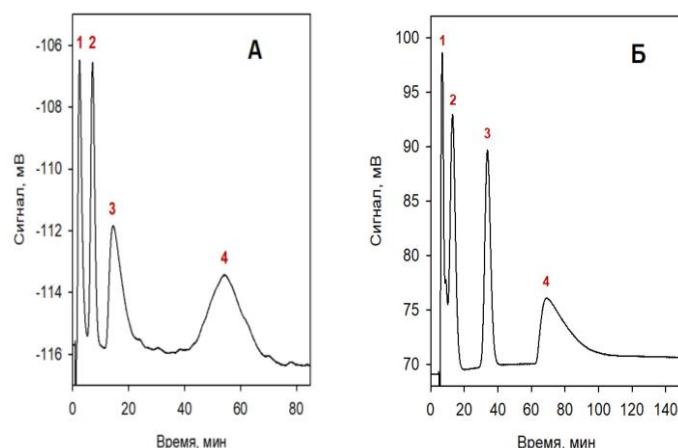


Рис. 7. Разделение модельных смесей полиолов и воды. Колонка 13X 50x4.6 мм, 4 мкм. Элюент – метанол; 0.5 см³/мин (А) и 0.1 см³/мин (Б), 35°C; РД. Пики: 1 – 1,2-пропандиол, 2 – этиленгликоль, 3 – вода, 4 – глицерин на хроматограмме справа и 1 – 1,2-бутандиол, 2 – 1,2-пропандиол, 3 – этиленгликоль, 4 – вода.

Fig 7. Separation of model mixtures of polyols and water. Column: 13X, 50x4.6 mm, 4 μ m. Eluent: methanol; 0.5 ml/min (A) and 0.1 ml/min (B), 35°C; RD. Peaks: 1 – 1,2-propanediol, 2 – ethylene glycol, 3 – water, 4 – glycerol in the chromatogram on the right and 1 – 1,2-butanediol, 2 – 1,2-propanediol, 3 – ethylene glycol, 4 – water.

металла в структуре цеолита типа MeY (Me = Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Sr²⁺) становится особенно заметной [21]. Фруктоза сильнее удерживается на цеолите в Ca²⁺-форме благодаря ее способности к комплексообразованию с щелочноземельными металлами, в отличие от глюкозы, которая слабо адсорбируется. Кроме того, цеолит CaX адсорбировал фруктозу сильнее CaY, что авторы связывали с уменьшением пространства в CaY, оптимального для координации фруктозы. Значения k' уменьшаются в ряду арабиноза > фруктоза > манноза > глюкоза для калиевой формы и фруктоза > арабиноза > манноза > глюкоза для кальциевой формы. Авторы отмечают, что снижение числа ОН-групп в углеводах уменьшает взаимодействие с цеолитами. Следует отметить, что кинетические диаметры арабинозы (0.81 нм), мальтозы (1.11 нм), ксилозы (0.79 нм) и других сахаров [16] исключают возможность их проникновения внутрь большинства пор цеолита 13X диаметром 0.74 нм.

Для цеолита 13X наблюдали следующую последовательность удерживания сахаров: арабиноза > фруктоза > глюкоза > манноза > ксилоза при содержании

воды в элюенте более 20%, при уменьшении содержания воды в элюенте порядок менялся: арабиноза > глюкоза > фруктоза > манноза > ксилоза (рис. 6).

Разделение смеси полиолов на цеолите 13X. Многие полиолы являются ценными реагентами для промышленности. 1,2-пропиленгликоль является важным реагентом для производства насыщенных полиэфиров, фармацевтических препаратов, косметики и т.д. При синтезе 1,2-пропиленгликоля из биомассы в качестве примеси образуется этиленгликоль [22]. В процессе каталитического риформинга глицерина образуются 1,2-пропандиол, ацетон и этиленгликоль [23]. Этиленгликоль является незаменимым химическим веществом для производства полиэфиров, антифризов, растворителей, прекурсоров поверхностно-активных веществ и тд. В процессе углеродно-нейтрального синтеза этиленгликоля из биомассы из-за побочных реакций в качестве примесей получают 1,2-пропандиол и 1,2-бутандиол [24]. Большинство известных методов разделения, таких как дистилляция или перегонка, осложняются близостью физико-химических свойств перечисленных полиолов, в особенности, первых

членов гомологического ряда диолов, способных образовывать азеотропы. Кроме того, часто полиолы получают в разбавленных растворах, а нормальные температуры кипения 1,2-пропандиола и этиленгликоля выше, чем у воды, поэтому разделение методом дистилляции требует больших затрат энергии.

В работе была показана потенциальная возможность селективного жидкофазного разделения 1,2-пропандиола, этиленгликоля, воды и глицерина (рис. 7 А), а также 1,2-бутандиола, 1,2-пропандиола, этиленгликоля и воды (рис. 7 Б) на колонке с цеолитом 13Х. Потенциально, отделение воды от перечисленных компонентов имеет большое промышленное значение для выделения индивидуальных полиолов из водных растворов. Найденные условия разделения могут быть также использованы для количественного определения микропримесей воды в диолах с использованием способа, предложенного ранее в работе [15].

Заключение

Рассмотрены закономерности удерживания полиолов на цеолите 13Х в условиях ВЭЖХ и подтверждено наличие ЭИСЭ как составной части механизма разделения. Зависимости удерживания полиолов от длины углеводородного радикала совпадают с таковыми для одноатомных спиртов в отличие от тепловых эффектов сорбции. Изменения значений ΔH^{oo}

этиленгликоля и пропандиолов совпадают с изменениями $-\Delta H^{oo}$ одноатомных спиртов, в то время как для бутандиолов наблюдался резкий рост значений $-\Delta H^{oo}$ по сравнению с бутанолом, что связывают с ограничением свободного вращения и плотной упаковкой молекул в порах. Найдено, что такое изменение значений $-\Delta H^{oo}$ связано с проявлением энтальпийно-энтропийной компенсации, при которой стерические эффекты упаковки молекул в сопоставимую по размеру пору цеолита приводят к компенсационному росту энтропии.

Закономерности удерживания полиолов и сахаров на цеолите 13Х в метаноле и ацетонитриле с добавками воды соответствуют закономерностям хроматографии гидрофильных взаимодействий. Высокая селективность разделения смесей полиолов и воды перспективна для промышленного выделения низших представителей гомологического ряда полиолов в качестве индивидуальных соединений из сложных водосодержащих матриц, а также для определения микроколичеств воды в полиолах методом ВЭЖХ.

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. Nesterenko P.N., Palamareva M.D. Liquid Chromatography | Overview. Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition). Academic Press. Oxford, 2019: 174-181. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14214-3>
2. Luzanova V.D., Rozhmanova N.B., Lanin S.N., Nesterenko P.N. *J. Anal. Chem.*, 2024; 79: 1353-1363. <https://doi.org/10.1134/S1061934824700722>
3. Luzanova V.D., Rozhmanova N.B., Lanin S.N., Nesterenko P.N. *Sorbtsionnyye i*

khromatograficheskiye protsessy, 2023; 23: 691-704. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11576>

4. Wang Y., Zhao D. *Crystal Growth and Design*, 2017; 17: 2291-2308. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00287>

5. Nesterenko P.N., Kazakova V.D. *J. Chromatogr. Open*, 2025; 7: 100207. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2025.100207>

6. Puricelli S., Bruno G., Gatti C., Pont A.i., Mella M. *Appl. Surf. Sci.*, 2024; 657: 159596. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2024.159596>

7. Nesterenko P.N. *Laboratoriya i proizvodstvo*, 2022; 20 (1-2): 92-100.



<https://doi.org/10.32757/2619-0923.2021.1-2.20.92.100> (In Russ.)

8. Kazakova V.D., Rozhmanova N.B., Lanin S.N., Nesterenko P.N. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2025; 384 (113443). <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2024.113443>

9. Xiong P., He P., Qu Y., Wang L., Cao Y., Xu S., Chen J., Ammar M., Li H. *Green Energy & Environment*, 2021; 6: 102-113. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.12.006>

10. Otis J., Hofmann J., Schmidt T., Buttersack C., Gläser R. *Anal. Chim. Acta*, 2023; 1267 :341323. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341323>

11. Mallon E.E., Babineau I.J., Kranz J.I., Guefrachi Y., Siepmann J.I., Bhan A., Tsapatsis M. *J. Phys. Chem. B*, 2011; 115 (39): 11431-11438. <https://doi.org/10.1021/jp208143t>

12. Xiong R., Sandler S.I., Vlachos D.G. *Langmuir*, 2012; 28 (9): 4491-4499. <https://doi.org/10.1021/la204710j>

13. Mallon E.E., Jeon M.Y., Navarro M., Bhan A., Tsapatsis M. *Langmuir*. 2013; 29 (22): 6546-6555. <https://doi.org/10.1021/la4001494>

14. Copeland J.R., Shi X.-R., Sholl D.S., Sievers C. *Langmuir*, 2013; 29: 581-593. <https://doi.org/10.1021/la304074x>

15. Luzanova V.D., Rozhmanova N.B., Volgin Y.V., Nesterenko P.N., *Anal. Chim. Acta*,

2023; 1239:340697. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340697>

16. Lao J., Fu Q., Avendano M., Bentley J.A., Chiang Y., Realff M.J., Nair S. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2024; 12(38): 14173-14186. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c04121>

17. Asnin L.D., Stepanova M.V. *J. Chromatogr. A*, 2024; 1733:465250. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465250>

18. Fujisawa M., Kimura T., Takagi S. *Fluid Phase Equil.*, 1997; 136 (1-2): 197-205. [https://doi.org/10.1016/S0378-3812\(97\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0378-3812(97)00120-9)

19. Hercigonja R., Rakic V. *Science of Sintering*, 2015; 47 (1): 83-88.

20. Snyder L.R., Poppe H. *J. Chromatogr. A*, 1980; 184: 363-413.

21. Wach W., Fornfett I., Buttersack C., Buchholz K. *Anal. Methods*, 2018; 10: 1817-1832. <https://doi.org/10.1039/C7AY02634J>

22. Dhale A.D., Myrant L.K., Chopade S.P., Jackson J.E., Miller D.J. *Chem. Eng. Sci.*, 2004; 59(14): 2881-2890. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.02.018>

23. Fortea J., García L., Ruiz J., Oliva M., Arauzo J. *Processes*, 2021; 9(8): 1438. <https://doi.org/10.3390/PR9081438>

24. Ai S., Qin Y., Hong Y., Liu L., Yu W. *J. Catalysis*, 2022; 413: 870-879. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2022.07.034>

Информация об авторах / Information about the authors

В.Д. Казакова – м.н.с., аспирант Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

П.Н. Нестеренко – д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

V.D. Kazakova – Junior researcher, Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: viktorialuza-nova.1998@gmail.com. ORCID: 0000-0002-0788-6938, Russian Federation

P.N. Nesterenko – PhD, DSc, Professor, Leading Researcher, Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: p.nesterenko@phys.chem.msu.ru, ORCID: 0000-0002-9997-0650, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 07.10.2025; одобрена после рецензирования 12.11.2025; принята к публикации 19.11.2025.

The article was submitted 07.10.2025; approved after reviewing 12.11.2025; accepted for publication 19.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13417

Установление факторов влияния на селективность разделения карбоновых кислот на многофункциональном сорбенте на основе полистирол-дивинилбензола в смешанном режиме ВЭЖХ

Григорий Сергеевич Максимов, Илья Андреевич Дубинин,
Анастасия Владимировна Горбовская, Андрей Владимирович Пирогов,
Олег Алексеевич Шпигун, Алла Валерьевна Чернобровкина[✉]

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
chernobrovkina@analYT.chem.msu.ru[✉]

Аннотация. Произведена характеристика ионообменных свойств новой многофункциональной колонки на основе полистирол-дивинилбензола путем независимого варьирования параметров подвижной фазы в режиме гидрофильной хроматографии. Продemonстрировано существенное снижение анионообменной емкости сорбента в исследуемом диапазоне ${}^w\text{pH}$ 2.85-5.76, вероятно, вызванное наличием в функциональном слое аминогрупп разной степени замещенности, депротонируемых при повышении pH. Для органических кислот разной силы с ${}^w\text{p}K_a$ 1-5 зарегистрированы зависимости факторов удерживания от pH, а также определены величины относительных вкладов ионообменного механизма в общее удерживание. С ростом pH продемонстрировано снижение времен удерживания анионов и кислот с ${}^w\text{p}K_a < 4$ и увеличение для кислот с ${}^w\text{p}K_a > 4$, при этом первые преимущественно удерживались по ионообменному механизму во всем диапазоне, в то время как для кислот с ${}^w\text{p}K_a > 4$ вклад ионного обмена существенно снижался при повышении концентрации элюирующего иона (90-0%) при ${}^w\text{pH}$ 2.85. Показано, что для подобных анионообменников с высокой емкостью состояние аналита, зависящее от соотношения ${}^w\text{pH}$ подвижной фазы и ${}^s\text{p}K_a$ соединения, оказывает большее влияние на вид зависимости $k' - \text{pH}$, чем изменение заряда сорбента. Оптимальным условием разделения кислот разной силы является кислая среда ($\text{pH} \leq \text{p}K_a$), обеспечивающая удерживание по совокупности разных механизмов, а также контроль вклада электростатических взаимодействий путем варьирования концентрации элюирующего иона. Подобраны условия высокоэффективного (до 32 000 тт/м) и селективного разделения смеси 5 кислот за 5 мин. Показана возможность разделения ионизируемых соединений на базовом жидкостном хроматографе с применением новой многофункциональной колонки без привлечения оборудования для ионной хроматографии.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, ионная хроматография, ионный обмен, ионообменники, полистирол-дивинилбензол, карбоновые кислоты, смешанный режим ВЭЖХ.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 25-13-00132, 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.

Для цитирования: Максимов Г.С., Дубинин И.А., Горбовская А.В., Пирогов А.В., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В. Установление факторов влияния на селективность разделения карбоновых кислот на многофункциональном сорбенте на основе полистирол-дивинилбензола в смешанном режиме ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 5. С. 675-686. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13417>

Original article

Governing the separation selectivity of carbon acids on a novel poly(styrene-divinylbenzene)-based stationary phase in mixed-mode HPLC

Grigorii S. Maksimov, Ilya A. Dubinin, Anastasia V. Gorbovskaia,
Andrei V. Pirogov, Oleg A. Shpigun, Alla V. Chernobrovkina[✉]

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation, chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru[✉]

Abstract. The ion-exchange features of a new multifunctional polymer column in HILIC mode were examined by varying the mobile phase pH and counter ion concentration. A significant decrease in the column anion-exchange capacity was demonstrated in the range of ^wpH 2.85–5.76 which was attributed to the presence of secondary and tertiary amino groups in the functional layer. The k' -pH trends in the corresponding range were built for different organic acids ($^w\text{p}K_a$ 1–5) additionally the relative contributions of the ion-exchange to the overall retention were determined by eluting ion concentration altering. A decrease in the retention of anions and acids with $^w\text{p}K_a < 4$ and an increase for acids with $^w\text{p}K_a > 4$ was shown with rising pH. The ion-exchange impact in the retention of the latter ones significantly decreased by concentration rise at ^wpH 2.85, while the former being predominantly retained by the ion-exchange mechanism in the entire pH range. For such a high-capacity anion exchangers, the type of the k' -pH dependence was shown to be mostly determined by the analyte state, which in its turn depends on the ^spH and $^s\text{p}K_a$ values. Mobile phase of $\text{pH} \leq \text{p}K_a$ was found to be the most appropriate for separation of acids, providing retention by different mechanisms and allows practitioners to master electrostatic interactions by varying the concentration of the eluting ion. A mixture of 5 acids was entirely separated in five minutes with an efficiency of up to 32 000 plates/m in mixed-mode HPLC. A beneficial option of ionizable compounds separation on a novel polymer multifunctional column with no ion chromatography equipment being engaged has been shown in this work.

Keywords: hydrophilic interaction liquid chromatography, ion chromatography, ion exchange, electrostatic interactions, anion exchangers, poly (styrene-divinylbenzene), carbon acids, mixed-mode.

Acknowledgments: the work was carried out with the support of the Russian Science Foundation, grant No. 25-13-00132, using the equipment of the MSU CCP "Technologies for obtaining new nanostructured materials and their comprehensive research", acquired by MSU under the instrument base upgrade program as part of the national project "Science" and as part of the MSU Development Program.

For citation: Maksimov G.S., Dubinin I.A., Gorbovskaia A.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. Governing the separation selectivity of carbon acids on a novel poly(styrene-divinylbenzene)-based stationary phase in mixed-mode HPLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 675–686. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13417>

Введение

Гидрофильная хроматография (ГИХ) представляет собой активно развивающийся метод одновременного разделения и определения полярных гидрофильных соединений, к числу которых относятся многие биологически активные вещества, компоненты лекарств и их метаболиты [1]. Современным направлением развития метода ГИХ является применение в качестве неподвижных фаз ионообменников низкой емкости на основе полистирол-дивинил бензола (ПС-ДВБ), характеризующихся более широким диапазоном гидролитической устойчивости по

сравнению с силикагелем. Подобные сорбенты способны работать в смешанном режиме ВЭЖХ, осуществляя разделение соединений разной гидрофильности и заряда в ходе одного анализа [2]. Для этих целей гидрофобная полимерная матрица может быть эффективно экранирована гидрофильными полимерными слоями заданной архитектуры, наиболее подходящими для конкретной аналитической задачи [3]. В качестве модификатора, в частности, могут быть использованы полиэлектролитные цепочки, обеспечивающие высокую гидрофильность поверхности за счет кватернизованного азота в структуре функционального слоя [4]. При

этом удерживание вещества также может осуществляться за счет стэкинг-взаимодействий, например, $\pi - \pi$ типа, реализуемых между ароматической системой аналита и матрицей ПС-ДВБ. Для эффективной эксплуатации такого сорбента необходимо правильно оценивать его разделяющую способность в широком диапазоне рабочих условий.

Современным ограничением широкому распространению метода гидрофильной хроматографии является сложный механизм удерживания, сочетающий распределение, адсорбцию, а также электростатические взаимодействия [5], соотношение вкладов которых изменяется при смене рабочих условий, недостаточно описано в литературе и на практике значительно сказывается на результатах хроматографического анализа, сопровождаясь сложностями выбора колонки и условий определения. Существующие на настоящий момент способы описания колонок в ГИХ не предоставляют исчерпывающую информацию о свойствах сорбента и доминирующем механизме удерживания в разных условиях [6,7]. Для расширенной характеристики свойств неподвижной фазы был предложен подход, основанный на получении зависимостей факторов удерживания модельных аналитов от независимо варьируемых параметров подвижной фазы (доли сильного элюента, кислотности, концентрации элюирующего иона) [8-10]. Структура тестовых соединений, используемых для описания механизма удерживания, должна соответствовать минимальному числу реализуемых взаимодействий сорбат-сорбент. Полученные зависимости факторов удерживания интерпретируют в совокупности с применением основных физико-химических моделей удерживания. Общее удерживание представляют в виде суммы трех компонентов: ионного обмена, распределения и адсорбции (1).

$$k' = k'_{\text{ГИХ}} + k'_{\text{ИЭХ}} + k'_{\pi-\pi} = k'_{(\text{adsorption})} + D \frac{V_s}{V_m} + \frac{b_{\text{ИЭХ}}}{[\text{M}^-]} + k'_{\pi-\pi} \quad (1)$$

Углубленное изучение электростатических взаимодействий в рамках данного подхода позволяет установить условия разделения заряженных соединений в режиме ГИХ, что дает преимущества использования широко распространенного и доступного оборудования для ВЭЖХ без необходимости эксплуатации ионохроматографических систем, а также в перспективе – экспрессного прогнозирования условий одновременного определения соединений разного заряда в одном анализе.

Разделение органических кислот представляет собой важную аналитическую задачу [11-13]. Было продемонстрировано успешное разделение соединений данного класса на колонках на основе силикагеля в гидрофильном режиме [14]. При этом наилучшая селективность достигалась при условии $\text{pH} > \text{pK}_a$. Для колонок данного типа уже существуют зависимости удерживания от параметров подвижной фазы, позволяющие подобрать условия разделения. В то же время, для сорбентов на полимерной основе на настоящий момент такие сведения отсутствуют, что ограничивает возможности их применения. Целью данной работы является описание ионообменных свойств новой многофункциональной колонки на основе ПС-ДВБ, а также выбор условий разделения смеси органических кислот.

Экспериментальная часть

Неподвижная фаза. В данной работе использовали сорбент, синтезированный согласно [4] путем модифицирования аминированного полистирол-дивинилбензола, полученного в результате восстановительного аминирования продукта реакции Фриделя-Крафтса, полиэлектролитными цепочками, предварительно синтезированными по реакции 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира и диметиламина (обозначен в [6] как Р-DMA x3, рис. 1). Параметры исходной матрицы ПС-ДВБ – степень сшивки 50%, диаметр

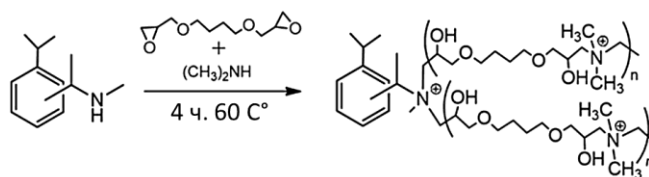


Рис. 1. Схема синтеза сорбента и его ожидаемая структура.
 Fig. 1. Adsorbent synthesis and the expected layer structure.

зерна 5,5 мкм, удельная площадь поверхности 650 м²/г, диаметр пор 4 нм. Заполнение хроматографической колонки 100 × 4 мм суспензией 1 г сорбента в 20 мл деионизованной воды проводили под давлением 400 бар аналогично [15]. В качестве подвижной фазы использовали 15 мМ раствор карбоната натрия.

Подвижная фаза. Для приготовления буферных растворов использовали следующие реактивы: ледяная уксусная кислота (w_pK_a 4.76), 99.5%; муравьиная кислота (w_pK_a 3.75), ч.д.а.; гидроксид натрия, ч.д.а. (Компонент-Реактив, Россия). Буферные растворы готовились *in situ* методом титрования 0.5 М раствором щелочи необходимого количества кислоты до заданной величины w_pH . Регистрировали значения времен удерживания при $w_pH=2.85$ (формиатные буферные растворы); 4.76 и 5.76 (ацетатные буферные растворы) при постоянной концентрации элюирующего иона 2.5 мМ в подвижной фазе. Измеряли и учитывали значения w_pH , относящиеся к подвижной фазе, а также с помощью уравнений Гендерсона-Хассельбаха и Дебая-Хюккеля рассчитывали погрешности их определения, вызванные варьированием концентрации. При w_pH 2.85 и 5.76 удерживание регистрировали при концентрациях элюирующего иона: 1.25; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 мМ в подвижной фазе. Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил 99.9%, (Компонент-Реактив, Россия). Для всех экспериментов подвижная фаза состояла из 90% ацетонитрила и 10% буферного раствора по объему.

Модельные соединения. В качестве тестовых соединений в работе использовали набор органических кислот разной

силы и гидрофильности и их солей: анионы (тозилат натрия – SPTS, п-стиролсульфонат натрия – SPSS), кислоты (2,4-динитробензойная, салициловая, п-нитробензойная, м-нитробензойная, бензойная, п-метилбензойная, п-метоксибензойная, никотиновая, п-аминобензойная, 3,4-диаминобензойная, фенилаланин, 2,4-динитрофенол) производства Sigma Aldrich (США) и TCI (Япония), со степенью чистоты >99.9%. Времена удерживания определяли по вводу пробы индивидуального соединения с концентрацией 100 мг/дм³ в среде, соответствующей составу подвижной фазы. Величины pK_a , а также параметры гидрофильности $\log P$ и $\log D$ рассчитывали с помощью программы ACD/Labs 12.0 (Канада) или платформы PubChem (NIH, USA).

Оборудование. Взятие навесок проводили на весах Explorer Pro («Ohaus Corporation», США), с точностью 0.0001 г. Для отбора аликвот использовали автоматические дозаторы LABMATE объемом 10-100, 100-1000 и 1000-5000 мкл («HTL», Польша) с пределом допустимой погрешности измерения не более 5%. Измерение pH растворов проводили с помощью pH -метра « pH -420» («Аквилон», Россия), откалиброванного по буферным растворам с w_pH 4.01, 6.86, 9.18. Дегазацию растворов осуществляли при помощи ультразвуковой ванны «Сапфир 6580» («Сапфир», Россия).

Для проведения экспериментов использовали жидкостной хроматограф ХРОМАТРОН-1411 производства АО «Лабтех», оснащенный четырехканальным насосом LC-1411QUA, автосамплером с термостатированием проб LC-1411ASCOL и детектором на диодной

матрице LC-1411DAD; жидкостной хроматограф Vanquish Flex с флуоресцентным детектором FLD и диодно-матричным детектором DAD; жидкостной хроматограф Dionex UltiMate 3000, оснащенный термостатируемым автосамплером, двухканальным насосом и диодно-матричным детектором. Регистрацию и обработку хроматограмм проводили при помощи ПО Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, США). Измерение времени удерживания осуществляли по хроматограммам индивидуальных веществ относительно воды как маркера мертвого времени для многофункциональной неподвижной фазы при скорости потока $1 \text{ см}^3/\text{мин}$, температуре колонки 25°C , УФ-детектировании при длинах волн 254, 220, 270 нм.

Для подтверждения результативности синтеза сорбента структуру привитых фрагментов изучали методом ГХ-МС с термодесорбцией с помощью системы Agilent GC (8890)-MS (5977B) (Agilent Technologies, США), состоящей из моноквадрупольного МС-детектора с источником электронной ионизации, термостата колонки, охлаждаемого узла ввода пробы, термодесорбера (TDU 2), автоматической роботизированной системы ввода пробы (Gerstel, Германия) и линии подачи газов (He , $1 \text{ см}^3/\text{мин}$). Использовали две соединенные последовательно колонки HP-5MS $15 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм}$, 0.25 мкм (Agilent Technologies, США), а также стеклянные термодесорбционные трубки ($5 \times 0.5 \text{ см}$), кварцевую стекловату ч.д.а. (TRAJAN, Австралия).

Описание механизма удерживания. Для заряженных соединений регистрировали зависимости факторов удерживания от концентрации элюирующего иона [ЭИ] в форме уравнения ионного обмена: $k' = f(1/[\text{ЭИ}])$. При экстраполяции на бесконечно большую концентрацию ЭИ получали факторы удерживания, вызванные неэлектростатическими взаимодействиями ($k'_{\text{ГХХ}} + k'_{\pi-\pi}$). Принимая посто-

янными величины $k'_{\text{ГХХ}} + k'_{\pi-\pi}$, определяли вклады ионного обмена в удерживание соединений для всех величин концентрации элюирующего иона. При этом общее удерживание рассматривали как сумму ($k'_{\text{ГХХ}} + k'_{\pi-\pi}$) и $k'_{\text{ЕХ}}$.

Обсуждение результатов

Согласно структуре, предполагаемой на основе элементного анализа и ГХ-МС с термодесорбцией, а также результатам теста Танака для гидрофильных сорбентов [4,6], используемая хроматографическая колонка характеризуется высокой анионообменной селективностью ($\alpha(\text{AX})=140$). С этой величиной согласуется отсутствие удерживания органических катионов и сильных оснований вследствие их электростатического отталкивания, экспериментально наблюдаемое во всем диапазоне рассматриваемых рабочих условий (^wpH 2.85-5.76 (^spH 5.5-9.2); $[\text{A}^-]$ 1.25-10 мМ). Сорбент продемонстрировал повышенную гидрофильность ($k'_U=1.5$), а также селективность по отношению к гидроксигруппам ($\alpha(\text{OH})=1.9$), что свидетельствовало об эффективном экранировании гидрофобной матрицы ПС-ДВБ полиэлектролитными цепочками с кватернизованным азотом в структуре функционального слоя. Эти параметры характеризуют перспективность данной неподвижной фазы для разделения кислотных соединений в режиме ГИХ.

Методология. Важным фактором, влияющим как на электростатические взаимодействия, так и на гидрофильность неподвижной фазы, является рН подвижной фазы. Определение кислотности в ГИХ осложнено тем, что подвижная фаза содержит превалирующую долю апротонного органического растворителя, что приводит к снижению силы кислот и оснований. Наиболее информативным подходом является использование двух шкал, первая из которых ^wpH относится к чистой воде, а вторая ^spH – к водно-органи-

ческой подвижной фазе конкретного состава [16-18]. Зависимость фактора удерживания аналита от рН в простейшем виде, когда аналит или сорбент нейтрален, описывается уравнением, введенным Хорватом и соавт. [19, 20]. В общем виде реальные зависимости являются комбинацией графиков соответствующего уравнения и представляют собой, как правило, кривые с максимумом, расположенным вблизи величины ${}^w\text{p}K_a$ [21].

Зависимость удерживания от концентрации элюирующего иона в форме уравнения ионного обмена (2) позволяет оценить относительный вклад последнего в удерживание ионизируемых аналитов путем экстраполяции факторов их удерживания на бесконечно большую концентрацию элюирующего иона, когда ионный обмен подавлен [11, 22, 23]. Угол наклона уравнения ионного обмена в логарифмическом виде соответствует отношению зарядов аналита и элюирующего иона (3). Электростатические взаимодействия могут оказывать определяющее влияние на разделение, возможность их контролировать позволяет добиться высокой селективности разделения ионизируемых аналитов в смешанном режиме ВЭЖХ. К такому типу задач относится определение органических кислот [11, 24, 25].

$$k' = \frac{V_S}{V_M} K_{\text{IEX}} \frac{[-NR_3^+]}{[M^-][H^+]} + k'_{\text{ГИХ}}, \quad (2)$$

$$\lg k'_{\text{IEX}} = \lg b_{\text{IEX}} + a \quad (3)$$

Зависимость удерживания от кислотности подвижной фазы. Варьирование рН подвижной фазы производили с использованием буферных растворов на основе формиата и ацетата аммония с постоянной концентрацией элюирующего иона, равной 2.5 мМ в подвижной фазе. Тозил-(SPTS) и стиролсульфоокислоты (SPSS) в соответствии с величинами их ${}^w\text{p}K_a \approx -2.8$ находятся в форме анионов во всем исследуемом диапазоне рН подвижной фазы. Для данного класса соединений наблюдали существенное снижение факторов удерживания при увеличении рН

элюента, что может быть вызвано снижением эффективного положительного заряда поверхности сорбента (рис. 2А). Вероятно, это связано с неполным алкилированием аминогрупп сорбента в процессе синтеза, в результате чего в функциональном слое могут присутствовать аминогруппы разной степени замещенности, способные протонироваться при низких значениях рН подвижной фазы. Соответственно, при повышении рН происходит снижение анионообменной емкости колонки в результате депротонирования. Несмотря на величину $\log D$, наблюдали большее удерживание 2,4-динитробензойной кислоты (${}^w\text{p}K_a=1.4$) по сравнению с сульфонатами, при этом зависимость от рН была аналогичной. В то же время, для более слабых кислот (п-нитробензойная (${}^w\text{p}K_a=3.4$), м-нитробензойная (${}^w\text{p}K_a=3.5$) и никотиновая (${}^w\text{p}K_a=4.8$)) наблюдали увеличение времен удерживания с повышением рН, что связано, в первую очередь, с усилением ионного обмена, вызванным увеличением степени диссоциации аналита по мере приближения рН элюента к величине $\text{p}K_a$. Равнозначное удерживание п- и м-нитробензойных кислот отражает отсутствие селективности колонки к структурным изомерам за счет неспецифических электростатических взаимодействий.

Салициловая кислота (${}^w\text{p}K_a=3.0$) и 2,4-динитрофенол (${}^w\text{p}K_a=4.0$) показали аномально высокое удерживание при ${}^w\text{pH}$ 2.85, учитывая величины $\log D$, а также пониженный вклад ионного обмена по сравнению с сульфонатами и нитробензойными кислотами. При повышении ${}^w\text{pH}$ до 4.26 регистрировали снижение их факторов удерживания, несмотря на ожидаемое увеличение вклада ионного обмена, при этом дальнейшего изменения удерживания не наблюдали. Такая необычная зависимость может быть вызвана изменением доминирующего механизма удерживания соединений в данном диапазоне, осложненным

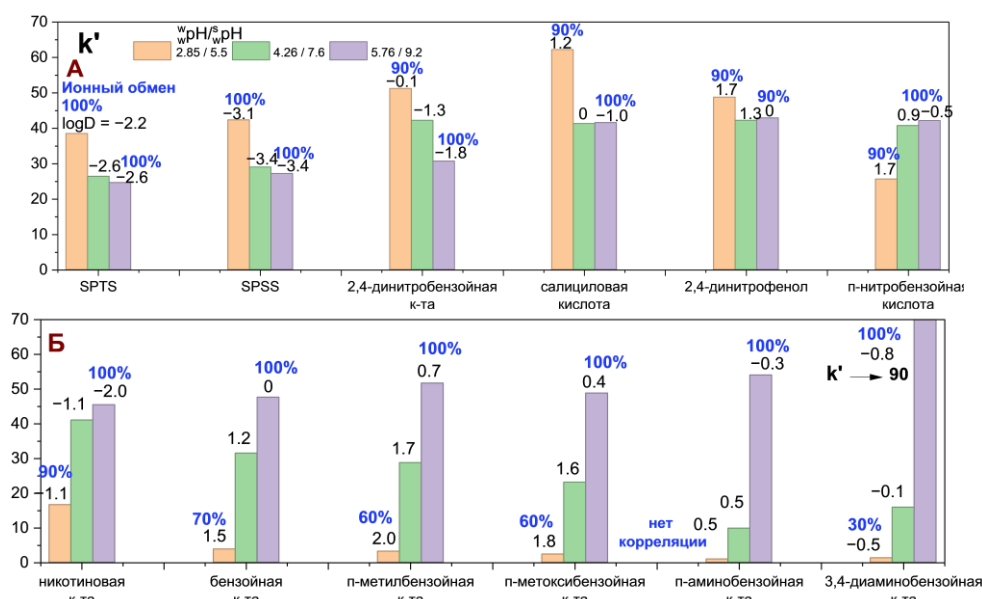


Рис. 2. Гистограммы зависимостей фактора удерживания от pH подвижной фазы с относительным вкладом ионного обмена в удерживание (%) при 2.5 мМ [HCOO⁻]; А – $w_pK_a < 4$, Б – $w_pK_a > 4$. Подвижная фаза: HCOOH/HCOONa $w_pH = 2.85$, ($s_pH = 5.5$) и CH₃COOH/CH₃COONa $w_pH = 5.76$ ($s_pH = 9.2$); (2.5 мМ [HCOO⁻] в ПФ) – CH₃CN 10:90 об.%; скорость потока 1 см³/мин; Т(колонки)=25 С°; УФ-детектирование 254; 220 нм. Параметры logD для соединений рассчитаны с помощью программы ACD/Labs 12.0 для всех значений w_pH .

Fig. 2. Retention factor vs. pH histograms with relative ion exchange impact to retention (%) at 2.5 mM [HCOO⁻]; А) – $w_pK_a < 4$, Б) – $w_pK_a > 4$. Mobile phase: HCOOH/HCOONa $w_pH = 2.85$, ($s_pH = 5.5$) and CH₃COOH/CH₃COONa $w_pH = 5.76$ ($s_pH = 9.2$); (2.5 mM [HCOO⁻] in mobile phase) – CH₃CN 10:90 vol. %; flow rate 1 ml/min; T(column)=25 C°; UV detection at 254; 220 nm. logD values were calculated with the aid of ACD/Labs 12.0 for each analyte corresponding to w_pH range.

возможностью образования внутримолекулярных водородных связей, ослабляющих как ионный обмен, так и способность к образованию водородных связей с функциональными группами сорбента.

Лучшие условия разделения кислот данной группы ($w_pK_a \leq 4$) достигались при $w_pH = 2.85$, но времена удерживания салициловой и динитробензойной кислот при этих условиях достаточно велики (более 45 мин), что выражалось в длительности анализа.

Для бензойной ($w_pK_a = 4.2$), п-метилбензойной ($w_pK_a = 4.4$) и п-метоксибензойной ($w_pK_a = 4.5$) кислот наблюдали увеличение факторов удерживания с повышением pH подвижной фазы, что связано с усилением ионного обмена, а также повышением гидрофильности ана-

лита (logD) вследствие увеличения степени диссоциации (рис. 26). При $w_pH = 2.85$ все рассматриваемые кислоты практически не диссоциированы и удерживаются благодаря неэлектростатическим взаимодействиям, обусловленным взаимодействиями молекулярной формы с матрицей и приповерхностными слоями – функциональным и адсорбированным водным. При этом, селективность их разделения по оставшимся механизмам при сходстве структуры низка. Лучшие условия разрешения кислот данной группы ($4 \leq w_pK_a \leq 5$) достигнуты при pH, близком к их pK_a ($w_pH = 4.26$), за счет различной способности к ионному обмену, а также взаимодействиям неэлектростатической природы.

Таблица 1. Изменение вклада ионного обмена в удерживание в зависимости от концентрации элюирующего иона для тестовых аналитов при $w_pH = 2.85$, $s_pH = 5.5$; $[HCOO^-] = 1.25$; 2.5; 5.0; 7.5 mM; $n = 4$, $P = 0.95$. Остальные условия указаны в подписи к рис. 2.

Table 1. Relative ion exchange impacts in test analytes' retention at varied counter ion concentration at $w_pH = 2.85$, $s_pH = 5.5$; $[HCOO^-] = 1.25$; 2.5; 5.0; 7.5 mM; $n = 4$, $P = 0.95$. Other conditions are listed in Fig. 2.

Аналит	w_pK_a	a	$k'_{гик}$	r	Вклад ионного обмена в удерживание, %			
					1.25 mM	2.5 mM	5 mM	7.5 mM
SPSS	Анион	$-(0.9 \pm 0.2)$	1.5	0.999	98 \pm 6	100 \pm 10	90 \pm 20	90 \pm 30
SPTS	Анион	$-(0.9 \pm 0.2)$	1.8	0.999	97 \pm 8	90 \pm 20	90 \pm 30	90 \pm 30
2,4-динитробензойная к-та	1.4	$-(0.9 \pm 0.2)$	3.0	1.000	96 \pm 6	90 \pm 10	90 \pm 20	80 \pm 30
салициловая к-та	3.0	$-(0.9 \pm 0.2)$	3.8	1.000	96 \pm 4	92 \pm 7	90 \pm 10	80 \pm 20
п-нитробензойная к-та	3.4	$-(0.87 \pm 0.05)$	2.5	1.000	93 \pm 3	88 \pm 6	80 \pm 10	70 \pm 20
м-нитробензойная к-та	3.5	$-(0.86 \pm 0.04)$	2.3	1.000	94 \pm 2	89 \pm 4	81 \pm 6	73 \pm 9
2,4-динитрофенол	4.0	$-(0.9 \pm 0.1)$	3.0	1.000	96 \pm 3	92 \pm 6	90 \pm 10	80 \pm 20
бензойная к-та	4.2	$-(0.6 \pm 0.2)$	1.0	1.000	81 \pm 3	68 \pm 5	53 \pm 7	41 \pm 8
п-метилбензойная к-та	4.4	$-(0.5 \pm 0.2)$	1.1	1.000	74 \pm 3	59 \pm 5	43 \pm 7	31 \pm 8
п-метоксибензойная к-та	4.5	$-(0.5 \pm 0.2)$	0.9	1.000	71 \pm 3	55 \pm 5	39 \pm 7	28 \pm 8
никотиновая к-та	4.8	$-(0.84 \pm 0.08)$	1.9	0.999	92 \pm 8	90 \pm 20	70 \pm 30	60 \pm 30
п-аминобензойная к-та	4.9	$-(0.3 \pm 0.2)$	0.5	0.994	50 \pm 10	–	–	–
3,4-диаминобензойная к-та	5.0	$-(0.3 \pm 0.2)$	0.7	1.000	46 \pm 2	30 \pm 2	18 \pm 2	13 \pm 3
фенилаланин	амфолит	$-(0.23 \pm 0.09)$	3.5	0.997	40 \pm 6	25 \pm 7	–	–

Частичная диссоциация 3,4-диаминобензойной ($w_pK_a = 5.0$) и 4-аминобензойной ($w_pK_a = 4.9$) кислот наблюдалась только при $w_pH = 5.76$. При этом регистрировали аномальное увеличение времени удерживания по сравнению с более сильными кислотами, что может быть связано со специфическими взаимодействиями, в частности, образованием комплексного соединения. Вероятно, в данном случае реализуется сочетание гидрофильных, гидрофобных и специфических взаимодействий, приводящих в совокупности с усиливающимся ионным обменом к увеличению удерживания в 7-8 раз, что важно принимать во внимание при определении соединений данного типа на колонках схожей функциональности. Аналогичную зависимость фактора удерживания от pH продемонстрировал фенилаланин.

Таким образом, в силу высокой анионообменной емкости сорбента во всем диапазоне условий, профиль зависимости удерживания от pH элюента определяется в первую очередь состоянием аналита, в то время как изменение состояния функционального слоя сорбента влияет на величину изменения фактора удерживания.

Механизм удерживания кислотных соединений на данной колонке является комплексным. Кроме ионного обмена, а также удерживания за счет распределения в приповерхностный водный слой, диполь-дипольных взаимодействий, водородных связей имеет место взаимодействие с матрицей. Более точное определение относительных вкладов взаимодействий каждого типа в удерживание рассматриваемых соединений, а также их изменение в широком диапазоне условий требует дальнейших исследований.

Электростатические взаимодействия. Варьируя концентрацию элюирующего иона независимо от pH подвижной фазы, согласно используемому подходу, можно управлять вкладом ионного обмена в удерживание ионизируемых аналитов, тем самым моделируя селективность. В таблицах 1 и 2 приведены относительные вклады ионного обмена, а также величины угловых коэффициентов (a) для кислот разной силы, полученные по результатам статистической обработки зависимостей удерживания от концентрации элюирующего иона в граничных точках диапазона w_pH 2.85 и 5.76. Ионный

Таблица 2. Изменение вклада ионного обмена в удерживание в зависимости от концентрации элюирующего иона для тестовых аналитов при $w\text{pH} = 5.76$, $s\text{pH} = 9.2$; $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 2.5; 5.0; 7.5; 10.0$ mM. Остальные условия указаны в подписи к рис. 2, табл.1.

Table 2. Relative ion exchange impacts in test analytes' retention at varied counter ion concentration at $w\text{pH} = 5.76$, $s\text{pH} = 9.2$; $[\text{HCOO}^-] = 2.5; 5.0; 7.5; 10.0$ mM. Other conditions are listed in Fig. 2 and Table 1.

Аналит	$w\text{pK}_a$	a	$k'_{\text{гх}}$	r	Вклад ионного обмена в удерживание, %			
					2.5 mM	5 mM	7.5 mM	10 mM
SPSS	Анион	$-(0.91 \pm 0.08)$	1.2	1	95 \pm 4	91 \pm 7	90 \pm 10	80 \pm 10
SPTS	Анион	$-(0.9 \pm 0.1)$	1.1	1	95 \pm 3	91 \pm 6	87 \pm 8	80 \pm 10
2,4-динитробензойная к-та	1.4	$-(0.90 \pm 0.09)$	1.3	0.999	95 \pm 3	91 \pm 6	86 \pm 9	80 \pm 10
салициловая к-та	3.0	$-(0.93 \pm 0.04)$	1.3	1	96 \pm 3	93 \pm 6	89 \pm 8	90 \pm 10
п-нитробензойная к-та	3.4	$-(0.93 \pm 0.06)$	1.2	1	96 \pm 3	93 \pm 5	90 \pm 7	87 \pm 9
м-нитробензойная к-та	3.5	$-(0.93 \pm 0.06)$	1.2	1	96 \pm 3	93 \pm 5	90 \pm 7	87 \pm 9
2,4-динитрофенол	4.0	$-(0.89 \pm 0.03)$	2.2	1	94 \pm 5	88 \pm 8	80 \pm 10	80 \pm 20
бензойная к-та	4.2	$-(0.96 \pm 0.05)$	0.9	1	98 \pm 2	96 \pm 4	94 \pm 5	92 \pm 7
п-метилбензойная к-та	4.4	$-(0.96 \pm 0.04)$	0.8	1	98 \pm 2	96 \pm 4	94 \pm 6	93 \pm 7
п-метоксибензойная к-та	4.5	$-(0.97 \pm 0.05)$	0.7	1	98 \pm 3	96 \pm 5	95 \pm 7	93 \pm 9
никотиновая к-та	4.8	$-(0.95 \pm 0.05)$	1.1	1	97 \pm 4	94 \pm 6	92 \pm 9	90 \pm 10
п-аминобензойная к-та	4.9	$-(0.98 \pm 0.05)$	0.5	1	99 \pm 2	98 \pm 4	97 \pm 5	96 \pm 7
3,4-диаминобензойная к-та	5.0	$-(0.93 \pm 0.07)$	2.4	1	97 \pm 3	94 \pm 5	90 \pm 8	90 \pm 10
фенилаланин	амфолит	$-(0.8 \pm 0.3)$	2.1	0.997	90 \pm 10	80 \pm 20	80 \pm 20	70 \pm 30

обмен относится к неспецифическим взаимодействиям, поэтому при доминирующем вкладе последнего аналиты могут быть разделены только на основании взаимодействий другого типа, что сокращает выбор условий их разрешения. Варьируя кислотность подвижной фазы, можно изменять состояние аналитов и, соответственно, долю ионного обмена в комплексном механизме их удерживания.

Так, при $w\text{pH} 2.85$ не все кислоты диссоциированы в достаточной степени, для аналитов с $w\text{pK}_a > 4$ наблюдается заметный вклад взаимодействий неэлектростатической природы. Соответственно, можно добиться разделения кислот разной силы за счет изменения вклада ионного обмена, варьируя концентрацию элюирующего иона в диапазоне, обеспечивающем достаточную буферную емкость.

При $w\text{pH} 5.76$ практически все кислоты диссоциированы в той или иной степени, вклад ионного обмена максимален и слабо подвержен влиянию концентрации элюирующего иона, которая уже не будет эффективным инструментом подбора условий разделения, согласно близости величин угловых коэффициентов логарифмической зависимости a к заряду

аналита (табл. 2). Таким образом, с увеличением (уменьшением) концентрации ожидается общее снижение (повышение) времен удерживания без изменения селективности разделения кислот.

Выбор условий разделения. На основании результатов независимого варьирования pH и концентрации элюирующего иона в подвижной фазе, можно определить условия полного разделения смеси ионизируемых соединений в смешанном режиме ВЭЖХ. Для того, чтобы разделить кислоты разной силы, нужно иметь в виду профиль зависимости их удерживания от pH, а именно куполообразную кривую, максимум которой определяется величиной $s\text{pK}_a$ аналита. Сильные кислоты, доминирующим механизмом для которых является ионный обмен, могут быть разделены только на основе специфических взаимодействий с сорбентом (гидрофобность SPSS и SPTS). Условием наилучшего разделения близких по силе кислот является создание в подвижной фазе $\text{pH} = \text{pK}_a$ ($w\text{pH} = 2.85$ для нитробензойных кислот). Наиболее полное разделение смеси алкил-, алкокси- и аминокислот достигается при $w\text{pH} =$

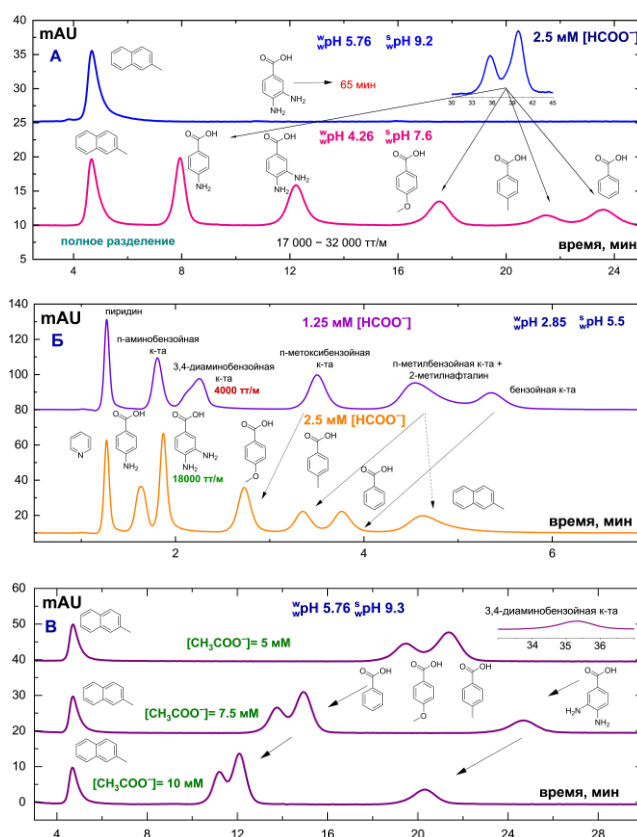


Рис. 3. Хроматограммы модельных смесей бензойных кислот, 100 ppm. А) $w_{pH} = 5.76$; 4.26 ($s_{pH} = 9.2$; 7.6); $[HCOO^-] = 2.5$ mM Б) $w_{pH} = 2.85$ ($s_{pH} = 5.5$); $[HCOO^-] = 1.25$; 2.5; В) $w_{pH} = 5.76$ ($s_{pH} = 9.2$); $[HCOO^-] = 5$; 7.5; 10 mM; 90 об.% CH_3CN ; $T(колонки) = 25$ °C; скорость потока 1 см³/мин, УФ-детектирование при 254 нм.

Fig. 3. Model mixtures of benzoic acids chromatograms, 100 ppm. А) $w_{pH} = 5.76$; 4.26 ($s_{pH} = 9.2$; 7.6); $[HCOO^-] = 2.5$ mM Б) $w_{pH} = 2.85$ ($s_{pH} = 5.5$); $[HCOO^-] = 1.25$; 2.5; В) $w_{pH} = 5.76$ ($s_{pH} = 9.2$); $[HCOO^-] = 5$; 7.5; 10 mM; 90 vol. % CH_3CN ; $T(column) = 25$ °C; flow rate 1 ml/min, UV detection at 254 nm.

4.26 с эффективностью до 32 000 тт/м (рис. 3а).

При $pH < pKa$ можно улучшать разрешение за счет изменения вклада ионного обмена путем варьирования концентрации элюирующего иона в подвижной фазе. Так, при $w_{pH} 2.85$ двукратное увеличение концентрации формиата в элюенте приводит к повышению селективности и позволяет разделить смесь 7 аналитов за 5 мин (рис. 3б). При этом, за счет ослабления ионного обмена также повышается эффективность – вплоть до 4 раз для некоторых веществ. При величинах pH, превышающих pKa большинства кислот, ионный обмен становится доминирующим, и разрешение ухудшается.

Таким образом, при $w_{pH} 5.76$ за счет преобладания ионного обмена в удерживании ионизированных аналитов разделение не происходит, а варьирование концентрации равнозначно изменяет факторы удерживания, не влияя на селективность (рис. 3в).

Заключение

Проведено описание ионообменных свойств новой многофункциональной колонки на основе ПС-ДВБ в режиме гидрофильной хроматографии. Продемонстрировано снижение анионообменной емкости вследствие наличия в функциональном слое сорбента аминогрупп разной степени замещенности. За счёт высо-

кой анионообменной емкости, вклад ионного обмена в удерживание соединений на данной колонке в основном определялся состоянием аналита, которое в свою очередь зависит от pH подвижной фазы и величины ${}^w pK_a$ определяемого соединения. Наилучшая селективность разделения для всех кислот достигалась при $pH \leq pK_a$. При ${}^w pH$ 2.85 кислоты с ${}^w pK_a < 4$ преимущественно удерживались по ионообменному механизму, в то время как для кислот с ${}^w pK_a > 4$ вклад ионного обмена существенно снижался при повышении концентрации элюирующего иона (90-0%). При ${}^w pH$ 5.76 показано доминирующее влияние ионного обмена для обеих групп. Полученные закономерности позволили выбрать наилучшие условия разделения кислотных и нейтральных соединений разной гидрофильности с эффективностью до 32 000 тт/м: для кислот

с ${}^w pK_a > 4$ – элюент с ${}^w pH$ 2.85; 4.26, $[HCOO^-] = 2.5$ мМ в ПФ; для кислот с ${}^w pK_a < 4$ – элюент с ${}^w pH$ 2.85 и $[HCOO^-] = 2.5-5$ мМ, в обоих случаях в соотношении 10/90 об.% с ацетонитрилом. Таким образом, путем грамотного варьирования влияющих параметров подвижной фазы можно добиться эффективного разделения ионизируемы соединений в изократическом гидрофильном режиме без привлечения оборудования для ионной хроматографии.

Конфликт интересов

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

Список литературы/References

1. Dejaegher B., Vander Heyden Y. *J. Sep. Sci. J Sep Sci*, 2010; 33(6-7): 698-715.
2. Zatrakha A. V., Smolenkov A. D., Shpigun O. A. *Anal. Chim. Acta*. 2016; 904: 33-50.
3. Chikurova N. Y., Gorbovskaia A. V., Stavrianidi A. N., Fedorova E. S., Shemyakina A. O., Buryak A. K., Uzhel A. S., Chernobrovkina A. V., Shpigun O. A. *J. Anal. Chem.* 2023; 78(7): 637-647
4. Gorbovskaia A. V., Kvachenok I. K., Stavrianidi A. N., Uzhel A. S., Shpigun O. A. *Microchem. J.* 2024; 199: 110075.
5. McCalley D. V. *Journal of Chromatography A*. 2017; 1523: 49-71.
6. Kawachi Y. *J. Chromatogr. A*. 2011; 1218(35): 5903-5919.
7. Iverson C. D., Gu X., Lucy C. A. *J. Chromatogr. A*. 2016; 1458: 82-89.
8. Khrisanfova A., Smagina M., Maksimov G., Tsizin G., Shpigun O., Chernobrovkina A. *J. Chromatogr. A*. 2025; 1758: 466201.
9. Shemiakina A., Xie A., Maksimov G., Chernobrovkina A. *LC-GC North Am.* 2024; International: 8-18.
10. Maksimov G. S., Shemiakina A. O., Uzhel A. S., Chernobrovkina A. V. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024; 24(2): 304-320.
11. McCalley D. V. *J. Chromatogr. A*. 2018; 1534: 64-74.
12. Škeřiková V., Jandera P. *J. Chromatogr. A*. 2010; 1217(51): 7981-7989.
13. Huang Y., Tian Y., Zhang Z., Peng C. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012; 905: 37-42.
14. Chernobrovkina A. V., Kryzhanovskaya D. S., Uzhel A. S., Tsizin G. I., Shpigun O. A. *Industrial laboratory. Diagnostics of materials*. 2025; 91(8): 7-15.
15. Gorbovskaia A. V., Popkova E. K., Uzhel A. S., Shpigun O. A., Zatrakha A. V. *J. Anal. Chem.* 2023; 78(6): 748-758.
16. Espinosa S., Bosch E., Roses M. *Anal. Chem.* 2000; 72(21): 5193-5200.
17. Gagliardi L. G., Castells C. B., Rafols C., Roses M., Bosch E. *Anal. Chem.* 2007; 79(8): 3180-3187.
18. Subirats X., Casanovas L., Redon L., Roses M. *Adv. Sample Prep.*, 2023; 6: 100063.
19. Horváth C., Melander W., Molnár I. *Anal. Chem.* 1977; 49(1): 142-154.
20. Alvarez-Segura T., Subirats X., Rosés M. *Anal. Chim. Acta*. 2019; 1050: 176-184.
21. Li R., Huang J. *J. Chromatogr. A*. 2004; 1041(1-2): 163-169.
22. Cox G. B., Stout R. W. *J. Chromatogr. A*. 1987; 384: 315-336.
23. Jovanović M., Stojanović B. J. *J.*



Chromatogr. A. 2013; 1301: 27-37.

24. Christopherson M.J., Yoder K.J., Hill J.T. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2006; 29(17): 2545-2558.

25. Qiu J., Craven C., Wawryk N., Carroll K., Li X-F. *J. Environ. Sci. (China)*. 2022; 117: 190-196.

Информация об авторах / Information about the authors

Г.С. Максимов – аспирант, м.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

И.А. Дубинин – студент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

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

А.В. Пирогов – д.х.н., проф. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

О.А. Шпигун – чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. 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 – the postgraduate student, Junior Researcher, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

I.A. Dubinin – student, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

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

A.V. Pirogov – Professor, Dr.Sci. (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

O.A. Shpigun – Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Dr.Sci. (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 27.10.2025; одобрена после рецензирования 20.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 27.10.2025; approved after reviewing 20.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13418

Закономерности удерживания неорганических ионов на аминированных неподвижных фазах на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола в среде с высоким содержанием ацетонитрила

Мария Алексеевна Смагина, Анна Олеговна Хрисанфова,
Елизавета Дмитриевна Иванова, Элина Алексеевна Каринская,
Михаил Александрович Статкус, Олег Алексеевич Шпигун,
Алла Валерьевна Чернобровкина[✉]

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

Аннотация. В данной работе изучали закономерности удерживания семи неорганических ионов (NO_3^- , Cl^- , K^+ , Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) на четырёх полярных неподвижных фазах на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола, содержащих аминогруппы разной степени замещённости, используя элюенты с содержанием ацетонитрила более 80 об.%. Летучий аммонийно-ацетатный буферный раствор с pH 4.7 в подвижной фазе обеспечивал постоянство степени диссоциации групп сорбентов и позволял регистрировать пики ионов с помощью испарительного детектора по светорассеянию.

Порядок элюирования как анионов, так и катионов, был одинаков на всех рассматриваемых сорбентах с анионообменной ёмкостью от 16 до 90 мкмоль/1 см³ колонки и противоположен типичному для ионной хроматографии. Увеличение концентрации буферного раствора ожидаемо приводило к уменьшению удерживания анионов и возрастанию для катионов, а увеличение содержания ацетонитрила в элюенте – к росту факторов удерживания катионов, снижению для нитрата и U-образной кривой удерживания для хлорида. Данные закономерности свидетельствовали, что для нитрата и хлорида реализуется ионный обмен наряду с адсорбцией и распределением в приповерхностный водный слой сорбентов. Значительные факторы удерживания катионов, подверженных электростатическому отталкиванию от аминированных фаз, обусловлены распределением, а также комплексообразованием ионов щелочноземельных металлов с азот- и кислородсодержащими группами сорбентов. Руководствуясь установленными закономерностями, а также влиянием гидрофильности, анионообменной ёмкости и комплексообразующих свойств неподвижных фаз на удерживание ионов, возможен выбор условий разделения неорганических ионов даже на анионообменниках с ёмкостью порядка 90 мкмоль/1 см³ колонки.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, неорганические ионы, ионный обмен, электростатическое отталкивание, распределение.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 25-13-00132, 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 н.с. Горбовской А.В. за любезно предоставленные сорбенты на основе полистирол-дивинилбензола.


Для цитирования: Смагина М.А., Хрисанфова А.О., Иванова Е.Д., Каринская Э.А., Статкус М.А., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В. Закономерности удерживания неорганических ионов на аминированных неподвижных фазах на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола в среде с высоким содержанием ацетонитрила // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 5. С. 687-696. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13418>

Original article

Retention trends for inorganic ions on aminated silica and poly(styrene-divinylbenzene)-based stationary phases in acetonitrile-rich mobile phases

Mariia A. Smagina, Anna O. Khrisanfova, Elizaveta D. Ivanova,

Elina A. Karinskaia, Mikhail A. Statkus, Oleg A. Shpigun, Alla V. Chernobrovkina 

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

Abstract. In this work, we studied the retention trends for seven inorganic ions (NO_3^- , Cl^- , K^+ , Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) on four polar stationary phases based on silica and poly(styrene-divinylbenzene) containing amino groups of various substitution degree. Mobile phases contained more than 80 vol.% of acetonitrile. A volatile ammonium acetate buffer solution pH 4.7 was added in the eluent to ensure a constant ionization state of the adsorbent groups and allowed us to use an evaporative light scattering detector. Columns possessed an anion exchange capacity from 16 to 90 μmol per 1 cm^3 of the column. The elution order of both anions and cations was the same for all the stationary phases and opposite to the one typical for ion chromatography. As expected, an increase in the buffer solution concentration led to a decreased retention of anions and increased one for cations. Increasing acetonitrile content in the eluent resulted in increased retention factors for cations, but decreased one for nitrate and a U-shaped retention curve for chloride. These patterns indicated that ion exchange is realized for nitrate and chloride along with adsorption and partitioning to the surface water layer of adsorbent. Significant retention factors of cations resulted from partitioning and complexation of alkaline earth cations with nitrogen- and oxygen-containing groups of adsorbents despite electrostatic repulsion from protonated amino groups. Guided by the established patterns, it is possible to select the conditions for simultaneous separation of inorganic ions even on anion exchangers with a capacity of about 90 $\mu\text{mol}/1 \text{ cm}^3$ of the column accounting for the influence of hydrophilicity, anion-exchange capacity, and complexing properties of stationary phases on ion's retention.

Keywords: hydrophilic interaction liquid chromatography, inorganic ions, ion exchange, electrostatic interactions, partitioning.

Acknowledgments: the work was carried out with the support of the Russian Science Foundation, grant No. 25-13-00132, using the equipment of the MSU CCP "Technologies for obtaining new nanostructured materials and their integrated research", acquired by MSU under the instrument base upgrade program within the framework of the national project "Science" and as part of the MSU Development Program. The authors would like to thank Gorbovskaya A.V. for kindly providing sorbents based on poly(styrene-divinylbenzene).

For citation: Smagina M.A., Khrisanfova A.O., Ivanova E.D., Karinskaia E.A., Statkus M.A., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. Retention trends for inorganic ions on aminated silica and poly(styrene-divinylbenzene)-based stationary phases in acetonitrile-rich mobile phases. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 687-696. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13418>

Введение

Определение ионов в различных реальных объектах чаще всего проводят в водной среде методом ионной хроматографии (ИХ) [1]. Одновременное разделение катионов и анионов требует использования специальных материалов и приёмов [2], например, неподвижных фаз, имеющих в структуре как положительно, так и отрицательно заряженные ионообменные центры [3], или введения в

элюент лигандов для связывания катионов в комплексные частицы, удерживающиеся на анионообменниках [4].

Альтернативным способом является использование в качестве подвижной фазы смеси воды с высоким содержанием ацетонитрила. В таком случае реализуется режим гидрофильной хроматографии (ГИХ), ключевой особенностью которого является проявление дополнительного механизма удерживания – распределения между элюентом и слоем воды, адсорбированным на полярной по-

верхности сорбента, имеющего заряженные группы. В данных условиях отмечают удерживание разноименно заряженных аналитов не только на сорбентах с привитыми цвиттер-ионными функциональными группами [5-7], но и с группами одного типа (кислотными или основными). В последнем случае удерживание иона на неподвижной фазе с одноименным зарядом происходит за счёт механизма распределения, несмотря на электростатическое отталкивание [8]. В большинстве работ авторы наблюдали данный эффект для высокогидрофильных органических ионов, кислот и оснований, например, пептидов [8], тиамина [9], никотиновой и аскорбиновой кислот [9], бензойной кислоты и ксантина [10]. Поскольку информация об удерживании неорганических катионов и анионов на основных неподвижных фазах, обеспечивающих высокие факторы удерживания многих полярных нейтральных аналитов [11], практически не представлена, то целью данной работы являлось изучение закономерностей удерживания ионов на аминированных сорбентах на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола. Потенциальная возможность одновременного разделения ионов разного знака заряда и нейтральных соединений привлекательна для решения сложных аналитических задач, связанных с анализом смесей из компонентов органической и неорганической природы, таких как фармпрепараты [5,7,12,13].

Экспериментальная часть

Оборудование и реактивы. Жидкостной хроматограф Shimadzu Prominence состоял из следующих блоков: насоса высокого давления LC-20AD с четырехканальным градиентным смесителем на стороне низкого давления, дегазатора DGU-20A5R, управляющего модуля CBM 20A, ручного инжектора Rheodyne 7725i, детектора по светорассеянию 35 ELSD-LT II. Сжатый воздух для детектора получали с помощью компрессора

Jun-Air OF302-25B. Давление сжатого воздуха для детектора составляло 350 кПа. Температуру нагрева испарителя и усиление детектора выбирали, исходя из высоты пиков на хроматограмме в ходе эксперимента. Объем пробы – 20 мкл. Хроматограммы регистрировали с помощью персонального компьютера и программного пакета LabSolutions (Shimadzu, Япония). Система ГХ-МС Agilent GC (8890)-MS (5977B) (Agilent Technologies, США), состоящая из моноквадрупольного МС детектора с источником электронной ионизации, термостата колонки, охлаждаемого узла ввода пробы, термодесорбера (TDU 2) и автоматической роботизированной системы ввода пробы (Gerstel, Германия) и линии подачи газов (He, 1 см³/мин), оснащенная двумя соединенными последовательно колонками HP-5MS 15 м × 0.25 мм, 0.25 мкм (Agilent Technologies, США), стеклянными термодесорбционными трубками (5 × 0.5 см) с кварцевой стекловатой ЧДА (TRAJAN, Австралия) использовалась для контроля синтеза и характеристики структуры неподвижных фаз.

Для отбора точной аликвоты использовали автоматические дозаторы LABMATE 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. Измерение pH проводили при помощи pH-метра «pH-420» («Аквилон», Россия), калиброванного по трем стандартным водным растворам со значениями pH 4.01, 6.86 и 9.18. Для очистки воды использовали деионизатор Milli-Q Elix Millipore («Milford», США).

Использовали следующие реактивы: толуол, х.ч; ацетонитрил для ВЭЖХ («Компонент-Реактив», Россия); хлорид калия, >99%; хлорид натрия, >99% (CDH, Индия); нитрат натрия, >99% (Merck, Германия);

Таблица 1. Функциональный слой используемых в работе неподвижных фаз и характеристики колонок

Table 1. Functional layer of the stationary phases and columns' characteristics

Наз-вание	Коммерческое название/название в других работах	Матрица	Функциональный слой	Размер частиц, мкм	Размер пор, нм	Размер колонки, мм	Ёмкость, мкмоль / 1 см ³ колонки*	Гидрофильность (k' (уридин))**	Производитель/ссылка
C1	Диасфер-110-Амин/М4	силикагель	3-аминопропил	5	11	3×100	33	3.8	ЗАО «Био-Хим МакСТ» [11]
C2	-/С-М		амидные группы, остаточные 3-аминопропильные группы				16	2.2	[16]
П1	-/BPEI-DMA	аминированный ПС-ДВБ	привитой полиэтиленмин и полиэлектролитный слой из 1,4-бутандиолдиглицидолового эфира и диметиламина	5.5	4	4×100	90	2.1	[14]
П2	-/BPEI-GI 80°C		привитой полиэтиленмин с кватернизацией NH ₂ -групп глицидолом				49	1.1	[15]

* Измерена методом ионной хроматографии в элюате путём заполнения колонки 20 мМ водным раствором NaCl и вытеснения 10 мМ водным раствором NaNO₃. Для колонок на силикагеле заполнение проводили при pH 3.5.

** Измерена в условиях теста Танака [17]: 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор pH 4.7 / CH₃CN 10/90 об.%.

хлорид лития, >98%; ацетат магния 4-водный, >98%; хлорид кальция, >98% («Реахим», Россия); кислота уксусная ледяная, 99.5% («Panreac», Испания); аммиак водный, ос.ч. («Сигма Тек», Россия).

Неподвижные фазы. Структура и характеристики неподвижных фаз на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола (ПС-ДВБ), используемых в работе, представлены в табл. 1. Синтез и свойства сорбентов C2, П1 и П2 были описаны в работах [14-16]. C2 был получен модифицированием 3-аминопропил-силикагеля нейтральными функциональными группами, проявление анионообменных свойств для него ожидали за счёт непрореагировавших в результате синтеза аминогрупп. Факторы удерживания

ионов, полученные на аминированных неподвижных фазах, сравнивали с таковыми на силикагеле (марка Kromasil, размер частиц 5 мкм, размер пор 11 нм, размер колонки 100×3 мм).

В работе поддерживали постоянной линейную скорость потока, равную 19.6 см/мин. Объёмная скорость потока для колонок диаметром 3 мм составляла 1.0 см³/мин, для колонок диаметром 4 мм – 1.8 см³/мин. Для определения мёртвого времени колонок на основе силикагеля использовали толуол, на основе полистирол-дивинилбензола – деионизованную воду.

Подвижная фаза. Аммонийно-ацетатный буферный раствор (ААБ) pH 4.7 готовили путем доведения pH раствора ук-

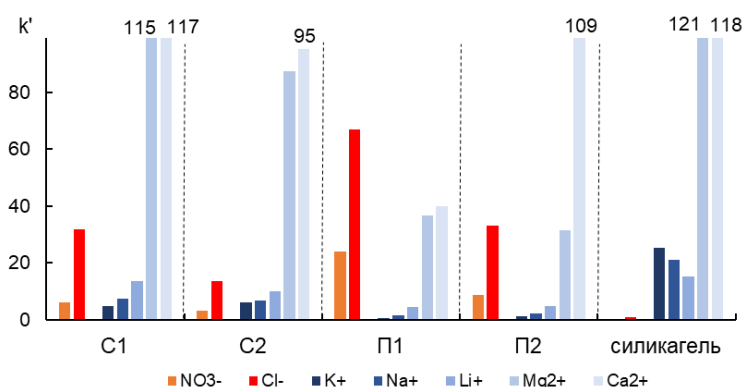


Рис. 1. Факторы удерживания ионов на силикагеле и колонках C1, C2, П1, П2.
Подвижная фаза: 100 мМ ААБ pH 4.7 / CH₃CN 10/90 об. %.

Fig. 1. Retention factors for ions on silica and S1, S2, P1, and P2 stationary phases.
Mobile phase: 100 mM ammonium acetate buffer pH 4.7 / CH₃CN 10/90 v/v.

сусной кислоты водным раствором аммиака до требуемого значения, используя рН-метр. Концентрация буферного раствора в водной части элюента составляла 50, 75, 100, 150, 200 мМ, что соответствовало 5, 7.5, 10, 15, 20 мМ концентрации ААБ в подвижной фазе, содержащей 90 об. % ацетонитрила. Для подвижных фаз с 6.7, 10, 12.5, 15.4, 18.2 и 20 об. % водной компоненты готовили буферный раствор с концентрациями 150, 100, 80, 65, 55 и 50 мМ, соответственно, что эквивалентно 10 мМ концентрации ААБ в элюенте.

Обсуждение результатов

Изучение закономерностей удерживания неорганических ионов (NO₃⁻, Cl⁻, K⁺, Na⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) проводили на четырех неподвижных фазах с преобладающими анионообменными свойствами (табл. 1), применение которых в режиме гидрофильной хроматографии было описано ранее [11,14-16]. Фазы имеют различные функциональные слои, содержащие аминокислоты разной степени замещенности, закрепленные на силикагеле (фазы C1 и C2) и полистирол-дивинилбензоле (П1 и П2). Последние представляют собой многофункциональные сорбенты, также пригодные для работы в режиме ионной и обращенно-фазовой

хроматографии [14,15]. В качестве подвижной фазы использовали смесь летучего аммонийно-ацетатного буферного раствора pH 4.7 и ацетонитрила, содержание которого составляло более 80 об. %. pH элюента поддерживали постоянным с целью обеспечения стабильности степени диссоциации групп сорбентов для получения воспроизводимых времен удерживания ионов. Высокая летучесть компонентов подвижной фазы позволяла использовать для регистрации пиков испарительный детектор по светорассеянию.

Порядок элюирования анионов: NO₃⁻ < Cl⁻, и катионов: K⁺ < Na⁺ < Li⁺ < Mg²⁺ ≤ Ca²⁺, при 80-93.3 об. % ацетонитрила и 5-20 мМ ААБ в элюенте был одинаков на всех аминированных неподвижных фазах (рис. 1) и противоположен порядку выхода, типичному для анионо- и катионообменной хроматографии в водной среде [1], а также согласовался с порядком элюирования на цвиттер-ионном сорбенте на основе полимера в режиме гидрофильной хроматографии [6]. Изменение селективности по сравнению с ИХ вызвано влиянием высокого содержания органического растворителя в подвижной фазе, приводящего к изменению характера взаимодействий между ионами и неподвижной фазой. Однако стоит отметить, что традиционный для ИХ порядок выхода однозарядных катионов соблюдался на

немодифицированном силикагеле в тех же условиях (рис. 1), свидетельствуя о преобладании ионообменного механизма удерживания, тогда как на аминированных фазах он согласовался с величинами их гидратированных радиусов ($r_{\text{гидр}}(\text{Li}^+) = 0.382$ нм, $r_{\text{гидр}}(\text{Na}^+) = 0.358$ нм, $r_{\text{гидр}}(\text{K}^+) = 0.331$ нм [18]). Можно заключить, что гидратная оболочка, сохраняющаяся даже в среде с высоким содержанием органического растворителя [19], способствует удерживанию катионов в иммобилизованном водном слое сорбента, несмотря на их ожидаемое отталкивание от протонированных аминогрупп. Чем она больше, тем меньше отталкивание катиона от одноименно заряженной неподвижной фазы. Для катионов кальция и магния факторы удерживания были сопоставимы с таковыми на немодифицированном силикагеле, в ряде условий значительно превышали таковые для анионов, а их симбатность с величинами гидратированных радиусов ($r_{\text{гидр}}(\text{Ca}^{2+}) = 0.412$ нм, $r_{\text{гидр}}(\text{Mg}^{2+}) = 0.428$ нм [18]) нарушалась, что, вероятно, вызвано влиянием комплексообразования с азот- и кислородсодержащими группами сорбентов. Меньшее удерживание нитрата по сравнению с хлоридом было обусловлено его большей гидрофобностью [13].

Структура неподвижной фазы влияла на абсолютные величины факторов удерживания и селективность разделения ионов разного заряда. Меньшие факторы удерживания катионов ожидаемо получены на сорбентах на основе ПС-ДВБ, имеющих большее число положительно заряженных центров, чем сорбенты на силикагеле, характеризующиеся также высокой гидрофильностью (табл. 1) и, следовательно, большей толщиной приповерхностного водного слоя. Исключением являлось значительное удерживание Ca^{2+} на колонке П2, вызванное, по видимому, присутствием в структуре функционального слоя сорбента хелатообразующих фрагментов этиленгликоля и этилендиамина (табл. 1). На фазах С1 и

С2 дополнительно возможно удерживание катионов на диссоциированных остаточных силанольных группах матрицы, что также обеспечивает сопоставимые факторы удерживания однозарядных ионов.

Влияние концентрации буферного раствора на удерживание ионов. Для выяснения механизма удерживания катионов и анионов на аминированных неподвижных фазах на основе силикагеля и полимерной матрицы в условиях, типичных для гидрофильной хроматографии, проводили варьирование концентрации буферного раствора в подвижной фазе, содержащей 90 об.% ацетонитрила, и доли воды при постоянной концентрации буферного раствора в элюенте (10 мМ). В качестве примера на рис. 2 представлены зависимости фактора удерживания ионов от данных параметров подвижной фазы, полученные на колонке П2. Для остальных фаз зависимости имели похожий вид, отличающиеся по абсолютным величинам факторов удерживания и в ряде случаев углом наклона (табл. 2).

Увеличение концентрации буферного раствора в подвижной фазе с 5 до 20 мМ приводило к существенному снижению факторов удерживания NO_3^- и Cl^- и возрастанию для K^+ , Na^+ и Li^+ на всех рассматриваемых сорбентах (рис. 2А, табл. 2). Полученные данные интерпретировали, используя бигарифмическую модель для ионного обмена:

$$\lg k' = s \lg [C] + \text{constant},$$

где угловой коэффициент s отражает вклад ионного обмена и силу электростатического отталкивания [20]. Стоит отметить, что в данном уравнении фигурирует концентрация элюирующего иона $[C]$ (в данном случае ацетата), однако для используемого буферного раствора нет возможности достоверно её установить из-за возникающего в среде с высоким содержанием ацетонитрила равновесия аммоний-аммиак [20,21]. Для получения зависимостей использовали общую концентрацию буферного раствора в элюенте C ,

которая прямо пропорциональна концентрации ацетата.

нием влияния электростатического отталкивания на их удерживание, реализу-

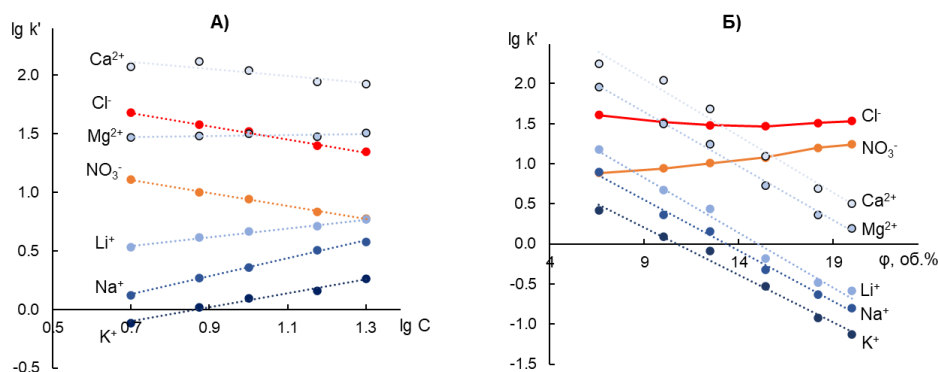


Рис. 2. Зависимость логарифмов факторов удерживания ионов на колонке П2 от А) логарифма концентрации буферного раствора в элюенте, подвижная фаза: ААБ pH 4.7 / CH_3CN 10/90 об.%, диапазон варьирования концентрации буферного раствора в элюенте от 5 до 20 мМ; Б) доли водной компоненты в элюенте, подвижная фаза: ААБ pH 4.7 / CH_3CN , концентрации буферного раствора в элюенте 10 мМ, диапазон варьирования доли воды от 6.7 до 20 об.%.
Fig. 2. The dependence of the logarithms of the ion retention factors on the P2 column on А) the logarithm of the buffer concentration in the eluent, mobile phase: ammonium acetate buffer pH 4.7 / CH_3CN 10/90 v/v, the range of the buffer concentration in the eluent was from 5 to 20 mM; B) the water proportion in the eluent, mobile phase: ammonium acetate buffer pH 4.7 / CH_3CN , the buffer concentration in the eluent was 10 mM, the range of the water proportion was from 6.7 to 20 vol.%.

Таблица 2. Угловые коэффициенты зависимостей фактора удерживания от концентрации буферного раствора C и доли воды в элюенте ϕ . Коэффициент корреляции $r > 0.87$. Условия приведены на рис. 2

Table 2. The slope coefficients of the dependences of the retention factor on the buffer concentration C and the water proportion in the eluent ϕ . Correlation coefficient $r > 0.87$. The conditions are shown in Fig. 2

Угловой коэфф.	$\lg k' - \lg C$				$\lg k' - \phi$			
	C1	C2	П1	П2	C1	C2	П1	П2
NO_3^-	-0.69	-0.46	-0.74	-0.55	0.02	0.02	0.03	0.03
Cl^-	-0.65	-0.54	-0.72	-0.56	-0.01*	0	-0.008**	-0.02**
K^+	0.59	0.46	0.93	0.60	-0.06	-0.07	-0.14	-0.11
Na^+	0.74	0.54	0.81	0.77	-0.08	-0.08	-0.13	-0.13
Li^+	0.57	0.41	0.51	0.38	-0.10	-0.10	-0.15	-0.14
Mg^{2+}	0.22	0.27	0.13	0	-0.12	-0.12	-0.15	-0.14
Ca^{2+}	0.25	0.33	0.11	-0.30	-0.12	-0.12	-0.15	-0.14

* в диапазоне ϕ от 6.7 до 18.2 об.%; ** в диапазоне ϕ от 6.7 до 15.4 об.%.
* in the range of ϕ from 6.7 to 18.2 vol.%; ** in the range of ϕ from 6.7 to 15.4 vol.%.

Было показано, что на всех неподвижных фазах угловой коэффициент s для анионов отличен от -1 (табл. 2), что свидетельствовало о реализации не только ионообменного механизма удерживания, но и иных типов взаимодействий с неподвижной фазой. Полученные для однозарядных катионов положительные угловые коэффициенты служили подтвержде-

ющегося в меньшей степени для Li^+ с большим радиусом гидратной оболочки. Наибольшее влияние концентрации буферного раствора на удерживание ионов (наибольшие абсолютные значения угловых коэффициентов s) одновременно с наибольшими факторами удерживания анионов и наименьшими для катионов было показано на колонке П1 с самой вы-

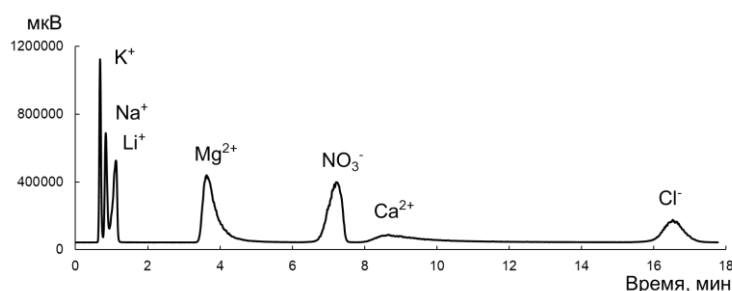


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси семи неорганических ионов на колонке П2. Условия: 65 mM аммонийно-ацетатный буферный раствор pH 4.7/CH₃CN 15.4/84.6 об.%, размер колонки 100×4 мм, скорость потока 1.8 см³/мин, испарительный детектор по светорассеянию. Концентрации аналитов: K⁺ – 60 мг/дм³, Na⁺ – 50 мг/дм³, Li⁺ – 30 мг/дм³, Mg²⁺ – 60 мг/дм³, Ca²⁺ – 120 мг/дм³, NO₃⁻ – 500 мг/дм³, Cl⁻ – 570 мг/дм³.

Fig. 3. The chromatogram of the model mixture of seven inorganic ions on the P2 column. Conditions: 65 mM ammonium acetate buffer pH 4.7/CH₃CN 15.4/84.6 v/v, column size 100×4 mm, flow rate 1.8 mL/min, evaporative light scattering detector. Analyte concentrations: K⁺ – 60 mg/L, Na⁺ – 50 mg/L, Li⁺ – 30 mg/L, Mg²⁺ – 60 mg/L, Ca²⁺ – 120 mg/L, NO₃⁻ – 500 mg/L, Cl⁻ – 570 mg/L.

сокой ёмкостью (табл. 1), демонстрирующее существенную роль данного свойства сорбента в удерживании ионов в элюенте с высоким содержанием ацетонитрила. Удерживание ионов Mg²⁺ и Ca²⁺ в меньшей степени зависело от концентрации аммонийно-ацетатного буферного раствора, чем удерживание однозарядных ионов. Данное наблюдение может служить подтверждением предположения о вкладе комплексообразования в их удерживание.

Влияние доли воды в элюенте на удерживание ионов. При увеличении доли воды в подвижной фазе как сильного растворителя в режиме ГИХ с 6.7 до 20 об.%, т.е. при уменьшении содержания ацетонитрила, наблюдали существенное снижение факторов удерживания всех рассматриваемых катионов (рис. 2Б, табл. 2) вплоть до $k'=0$ для K⁺ и Na⁺ на колонке П1 при 20 об.% водной компоненты в элюенте. Данный тренд является характерным для механизма распределения аналита между подвижной фазой и адсорбированным на поверхности сорбента слоем воды в режиме гидрофильной хроматографии. Реализация распределения для катионов на всех рассматриваемых фазах была подтверждена по линейности зависимости фактора удерживания от доли сильного растворителя в элюенте

(φ) в координатах $\lg k'$ от φ (табл. 2). Подобные выводы ранее были сделаны для катионов только на сорбентах, имеющих в функциональном слое одновременно положительно и отрицательные группы [13].

Удерживание нитрата возросло при увеличении содержания воды на всех неподвижных фазах, а хлорида изменялось нелинейно (рис. 2Б, табл. 2). В более узком диапазоне долей воды (от 6.7 до 18.2 или 15.4 об.%) в элюенте было отмечено проявление распределительного механизма удерживания для хлорида (табл. 2), однако при дальнейшем увеличении до 20 об.% также наблюдали рост фактора удерживания (рис. 2Б). Данный тренд напоминает U-образную кривую перехода от одного режима хроматографии к другому [13,22]. Возрастание удерживания анионов с увеличением доли воды в элюенте связано с рядом факторов, вытекающих из влияния ацетонитрила на диэлектрическую проницаемость среды, константы диссоциации и ионного обмена, а также толщину приповерхностного водного слоя. Уменьшение содержания ацетонитрила может приводить к увеличению степени протонирования первичных, вторичных и третичных аминогрупп сорбентов за счёт влияния органического растворителя на их pK_a [21] и,

как следствие, возрастанию силы притяжения анионов. Отмеченные факторы в результате приводят к увеличению вклада ионного обмена в удерживание, как было показано для аниона п-толуол-сульфоната на силикагеле, модифицированном эремомицином [20]. Возрастание удерживания нитрата во всём рассматриваемом диапазоне долей воды также обусловлено его большей гидрофобностью по сравнению с хлоридом [13]. Вероятно, в рассматриваемых условиях нитрат удерживается по смешанному механизму, включающему ионный обмен и адсорбцию.

Таким образом, зависимости, представленные на рис. 2, наглядно демонстрируют воздействие на селективность разделения ионов варьированием концентрации буферного раствора и доли воды в подвижной фазе в условиях гидрофильной хроматографии. На основании данных трендов возможен выбор условий экспрессного разделения смеси семи неорганических катионов и анионов на аминированных неподвижных фазах (рис. 3).

Заключение

На четырёх неподвижных фазах на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола с преобладающими анионообменными свойствами установлены механизмы удерживания неорганических анионов и катионов в условиях, соответствующих режиму гидрофильной хроматографии. В качестве подвижной фазы использовали смесь аммонийно-ацетатного водного буферного раствора pH 4.7 и ацетонитрила, совместимую с испарительным детектором по светорассеянию,

соотношение компонентов которой варьировали. Было показано, что угловые коэффициенты билогарифмической зависимости $\lg k' - \lg C$ для анионов составляли от -0.46 до -0.74 при 90 об.% ацетонитрила в подвижной фазе, подтверждая существенный вклад неэлектростатических взаимодействий в их удерживание. Меньшая гидрофильность нитрата по сравнению с хлоридом определяла его меньшие факторы удерживания, а также их возрастание с уменьшением содержания ацетонитрила в элюенте, свидетельствующее в пользу реализации адсорбции в дополнение к ионному обмену. Для хлорида также был отмечен вклад механизма распределения. Было установлено, что высокие факторы удерживания катионов: до 8 для K^+ , 15 для Na^+ , 40 для Li^+ и до 140 для Mg^{2+} и Ca^{2+} на фазах с анионообменными свойствами в рассматриваемых условиях, получены за счёт реализации распределительного механизма удерживания, а также комплексообразования ионов щелочноземельных металлов с донорными атомами в функциональном слое сорбентов. Одновременная реализация нескольких механизмов удерживания на гидрофильных неподвижных фазах, содержащих аминогруппы, в среде с высоким содержания ацетонитрила даёт уникальную возможность определения неорганических катионов и анионов в одном анализе, что невозможно в водной среде.

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. Weiss J. Handbook of Ion Chromatography. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016, 1553 p.
2. Nesterenko P.N. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2001; 20(6-7): 311-319.
3. Nesterenko E.P., Nesterenko P.N., Paull B. *Anal. Chim. Acta.* 2009; 652(1-2): 3-21.
4. IeGras C.A. *Analyst.* 1993; 118: 1035-1041.
5. Risley D.S., Pack B.W. *LCGC North Am.* 2006; 24(9): 82-90.
6. Liu X., Jiang Y., Zhang F., Li Z., Yang B. *J. Chromatogr. A.* 2021; 1649: 462229.
7. Huang Z., Richards M.A., Zha Y., Francis R., Lozano R., Ruan J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009; 50(5): 809-814.

8. Alpert A.J. *Anal. Chem.* 2008; 80(1): 62-76.
9. Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D. *J. Chromatogr. A* 2011; 1218(20): 2871-2879.
10. Shemiakina A., Xie A., Maksimov G., Chernobrovkina A. *LCGC Int.* 2024: 8-18.
11. Chikurova N.Y., Shemiakina A.O., Kryzhanovskaya D.S., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. *Lomonosov Chem. J.* 2023; 64(3): 245-255.
12. Zhang K., Dai L., Chetwyn N.P. *J. Chromatogr. A* 2010; 1217(37): 5776-5784.
13. Liu X., Pohl C.A. *J. Sep. Sci.* 2010; 33(6-7): 779-786.
14. Gorbovskaia A.V., Kvachenok I.K., Chikurova N.Y., Chernobrovkina A.V., Uzhel A.S., Shpigun O.A. *Microchem. J.* 2024; 207: 111802.
15. Gorbovskaia A.V., Popkova E.K., Uzhel A.S., Shpigun O.A., Zatirakha A.V. *J. Anal. Chem.* 2023; 78(6): 507-519.
16. Chikurova N.Y., Gorbovskaia A.V., Stavrianidi A.N., Fedorova E.S., Shemyakina A.O., Buryak A.K., Uzhel A.S., Chernobrovkina A.V., Shpigun O.A. *J. Anal. Chem.* 2023; 78(7): 637-647.
17. Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N. *J. Chromatogr. A* 2011; 1218(35): 5903-5919.
18. Volkov A.G., Paula S., Deamer D.W. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1997; 42(2): 153-160.
19. Osakai T., Ogata A., Ebina K. *J. Phys. Chem. B* 1997; 101(41): 8341-8348.
20. Khrisanfova A., Smagina M., Maksimov G., Tsizin G., Shpigun O., Chernobrovkina A. *J. Chromatogr. A* 2025; 1758: 466201.
21. Alvarez-Segura T., Subirats X., Rosés M. *Anal. Chim. Acta* 2019; 1050: 176-184.
22. Ibrahim M.E.A., Lucy C.A. *Talanta* 2012; 100: 313-319.

Информация об авторах / Information about the authors

М.А. Смагина – студент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

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

Е.Д. Иванова – студент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Э.А. Каринская – студент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

М.А. Статкус – д.х.н., в.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

О.А. Шпигун – чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. 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

M.A. Smagina – student, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

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

E.D. Ivanova – student, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

E.A. Karinskaia – student, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

M.A. Statkus – Leading Researcher, Dr.Sci. (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

O.A. Shpigun – Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Dr.Sci. (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 01.09.2025; одобрена после рецензирования 19.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 01.09.2025; approved after reviewing 19.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.631

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13419

Определение фтора во фторорганических соединениях методом ионной хроматографии сжигания

Светлана Юрьевна Петракова[✉], Вера Дмитриевна Тихова

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия,
petrakova@nioch.nsc.ru[✉]

Аннотация. Определение фтора как часть элементного анализа является важным шагом при характеристике фторорганических соединений. Целью данного исследования является демонстрация возможностей ионной хроматографии сжигания для определения содержания фтора в основном составе органических соединений.

Объектами анализа являются фторароматические соединения различного состава с содержанием фтора в диапазоне 8-60%. Растворы проб для анализа готовили растворением навесок массой 0.5-3 мг в 10 см³ этанола либо гексана. Для получения воспроизводимых результатов, если содержание фтора от 50 % и выше, масса навески не должна превышать 1.5 мг. Далее 10 мкл раствора пробы помещали в лодочку сэмплера с последующим введением в систему сжигания РАС Antek MultiTek. Проба сгорала при 1050°C, продукты сгорания поглощались деионизованной водой и анализировались на ионном хроматографе Thermo Scientific Dionex Integrion HPLC. Предварительно строилась градуировочная зависимость по растворам, приготовленным из пентафторбензойной кислоты (растворитель: этанол, диапазон концентраций фтора 10-110 мг/дм³). Было проведено определение содержания фтора во всех исследуемых объектах, полученные результаты согласуются с теоретически рассчитанными значениями. Правильность проверена путем анализа органического вещества с аттестованным значением содержания фтора (13.56%) – 4-фторбензойной кислоты, прецизионность оценивалась относительным стандартным отклонением 3-6 результатов анализа образцов на трех уровнях содержаний – 8.79, 17.35 и 59.35%. Относительное стандартное отклонение находилось в диапазоне 0.09-2.6%. Предел обнаружения и предел количественного определения фтора составили 0.6 и 2.1 мг/дм³ соответственно.

Таким образом, представленные в работе результаты демонстрируют успешное применение метода ионной хроматографии сжигания для определения фтора в основном составе ряда фторорганических соединений с точностью, удовлетворяющей требованиям элементного органического анализа. Возможности данного метода позволяют расширить его применение для определения и других гетероэлементов (Cl, Br, I, S, Se) как по отдельности, так и одновременно.

Ключевые слова: органический элементный анализ, определение фтора, ионная хроматография сжигания

Благодарности: авторы выражают благодарность химическому исследовательскому центру коллективного пользования СО РАН за проведение аналитических измерений.

Для цитирования: Петракова С.Ю., Тихова В.Д. Определение фтора во фторорганических соединениях методом ионной хроматографии сжигания // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 697-704. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13419>

Original article

Determination of fluorine in organofluorine compounds by combustion ion chromatography

Svetlana Yu. Petrakova[✉], Vera D. Tikhova

Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation, petrakova@nioch.nsc.ru[✉]

Abstract. Fluorine determination as part of elemental analysis is an important step for characterization of organofluorine compounds. The purpose of this study is to demonstrate the capabilities of combustion ion chromatography for the fluorine determination in the main composition of organic compounds.

The objects of analysis are various fluoroaromatic compounds with fluorine in the range of 8-60%. Sample solutions for analysis were prepared by dissolving 0.5-3 mg samples in 10 ml of ethanol or hexane. To obtain reproducible results, if the fluorine content is 50% or higher, the sample weight should not exceed 1.5 mg. Then 10 μ l of the sample solution was placed in a sampler boat and then introduced into the PAC Antek MultiTek combustion system. The sample was burned at 1050°C, the combustion products were absorbed with deionized water and analyzed by a Thermo Scientific Dionex Integrion HPIC ion chromatograph. A calibration curve was previously constructed using solutions prepared from pentafluorobenzoic acid (solvent – ethanol, fluorine concentration range 10-110 mg/l). Fluorine content in 6 compounds under study was determined; the results were consistent with theoretically calculated values. Accuracy was verified by analyzing an organic substance with a certified fluorine content value (13.56%) – 4-fluorobenzoic acid; precision was estimated by the relative standard deviation of 3-6 sample analysis results at three content levels – 8.79, 17.35, and 59.35%. The relative standard deviation was in the range 0.09-2.6%. The detection limit and the limit of quantification of fluorine were 0.6 and 2.1 mg/l, respectively.

Thus, the results presented in the work demonstrate the successful application of the combustion ion chromatography method for determining fluorine in the main composition of organofluorine compounds with an accuracy that meets the requirements of elemental organic analysis. The advantages of this method allow expanding its application for determining other heteroelements (Cl, Br, I, S, Se) both separately and simultaneously.

Keywords: organic elemental analysis, fluorine determination, combustion ion chromatography.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to the Chemical Research Center for Collective Use of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for conducting analytical measurements.

For citation: Petrakova S.Yu., Tikhova V.D. Determination of fluorine in organofluorine compounds by combustion ion chromatography. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 697-704. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13419>

Введение

Химия фторорганических соединений весьма разнообразна, и благодаря этому фторорганические соединения обладают множеством уникальных свойств и применяются в различных областях [1]. Они могут использоваться и для создания различных функциональных материалов, и в качестве лекарственных средств. Интерес к фторорганическим соединениям возник в начале XX века и продолжает расти и по сегодняшний день. Вместе с этим продолжают развиваться и способы анализа фторорганических соединений, поскольку перед их использованием необходимо провести характеристику данных веществ, и немаловажным ее этапом является элементный анализ в целом и определение содержания фтора в частности.

Перед определением гетероэлементов в составе органического вещества, в том числе и фтора, требуется минерализация органических соединений. Разложение в колбе, наполненной кислородом (метод Шенигера) и сжигание в токе кислорода –

популярные способы минерализации, которые активно используются до сих пор. С их помощью возможно разложение органической матрицы до простых компонентов, в случае фтора – фторидов. Далее фториды можно определять различными методами, среди которых можно выделить электрохимические [2,3], хроматографические [4,5], спектральные методы [6-8], использующиеся при анализе различных объектов. Анализ литературы показал, что такие аналитические характеристики представленных методик, как предел обнаружения и предел количественного определения, варьируются от нескольких мкг/дм³ для образцов природных вод до 0.01-0.1% для образцов горных пород. Относительное стандартное отклонение не превышает 5-10% для электрохимических, хроматографических и спектральных методов.

Ранее была разработана методика определения фтора после разложения вещества в колбе, наполненной кислородом, с последующим спектрофотометрическим определением фтора в виде его

комплекса с лантан-ализаринкомплексом [9]. Методика в течение многих лет успешно применяется для определения процентного содержания фтора в органических соединениях разнообразного состава. Хорошей альтернативой может стать ионная хроматография сжигания, позволяющая определять как фтор в основном составе, так и его примесь в различных объектах [10,11]. Некоторые преимущества ионной хроматографии сжигания:

- Отсутствие сложной пробоподготовки. Минерализация проходит автоматически, аналитику необходимо лишь отобрать навеску образца и растворить ее в подходящем растворителе;
- Возможность одновременного определения нескольких гетероэлементов – Cl, Br, I, S, Se и т. д., когда в распоряжении химика-аналитика имеется лишь небольшое количество вещества;
- Широкая область применения – от определения примесного состава (известные в литературе методики) до анализа основного состава.

Целью данного исследования является демонстрация возможностей ионной хроматографии сжигания для определения содержания фтора в органических соединениях.

Экспериментальная часть

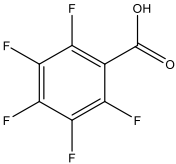
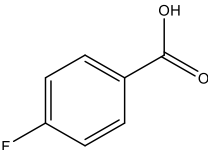
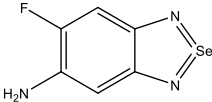
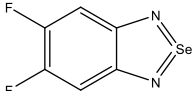
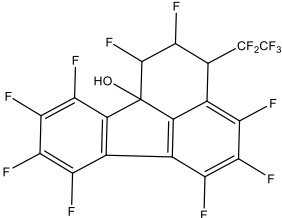
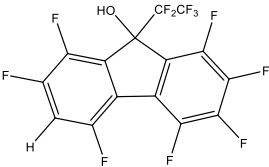
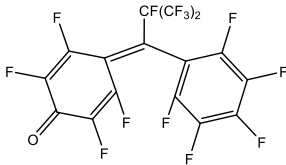
Реагенты и объекты анализа. В качестве стандартного вещества для построения градуировочной зависимости использовалась пентафторбензойная кислота (CAS 602-94-8). Для растворения исследуемых соединений и градуировочных стандартов использовали этанол 95% и гексан (сорт 1). 4-фторбензойная кислота (OAS Certificate №335658) использовалась в экспериментах по оценке правильности как стандартный образец для элементного анализа с аттестованным значением фтора – 13.56%. Элюент генерируется электролитически с использованием деионизованной воды типа I(18.2 МОм/см) и гидроксида калия из картри-

джа Dionex EGC 500 КОН. Деионизованная вода также использовалась для пиро-гидролиза и поглощения продуктов сгорания. В качестве объектов анализа использовались соединения, синтезированные в лаборатории гетероциклических соединений (соединения 1 и 2) и в лаборатории галоидных соединений (соединения 3-5) НИОХ СО РАН, их структуры и содержание в них фтора представлены в таблице 1. Структура и чистота данных веществ проверена комплексом методов – ЯМР, РСА, масс-спектрометрии высокого разрешения, также для всех соединений проведен элементный анализ.

Оборудование. Взвешивание образцов проводилось на микроаналитических весах Sartorius Cubis MSA36S-0CE-DH. Обработку растворов образца проводили на ультразвуковой ванне ТН-50В. Сжигание проб проводили с помощью системы сжигания PAC Antek MultiTek, оснащенной саплером для автоматического ввода пробы. Анализ поглотительного раствора после сжигания образцов проводили на ионном хроматографе Thermo Scientific Dionex Integrion HPIC, оснащенном аналитической колонкой AS11-HC-4 μ m (2 \times 250 mm) и предколонкой AG11-HC-4 μ m (2 \times 50 mm). Неподвижная фаза – сополимер полистирола и дивинилбензола с привитыми функциональными тетраалкалоламмониевыми группами.

Процедура анализа. Навески исследуемых веществ массой 0.5-3 мг взвешивали в стеклянные флаконы с завинчивающейся крышкой объемом 20 см³, добавляли 10 см³ подходящего растворителя (этанол или гексан) и обрабатывали в ультразвуковой ванне 1-2 мин до полного растворения образца. Аликвоту полученного раствора объемом 10 мкл отбирали в лодочку саплера, заполненную кварцевой ватой. Проба вводилась в систему сжигания и сгорала при температуре 1050 $^{\circ}$ C, продукты сгорания вместе с парами воды собирались и поглощались

Таблица 1. Структуры исследуемых соединений
Table 1. Structures of the studied compounds

 <p>Пентафторбензойная кислота (стандартное вещество для градуировки) %F=44.79%</p>	 <p>4-фторбензойная кислота (стандартное вещество для проверки правильности) %F = 13.56%</p>	
 <p>Соединение 1 %F=8.79%</p>	 <p>Соединение 2 %F=17.35%</p>	
 <p>Соединение 3 %F=52.96%</p>	 <p>Соединение 4 %F=53.50%</p>	 <p>Соединение 5 %F=59.35%</p>

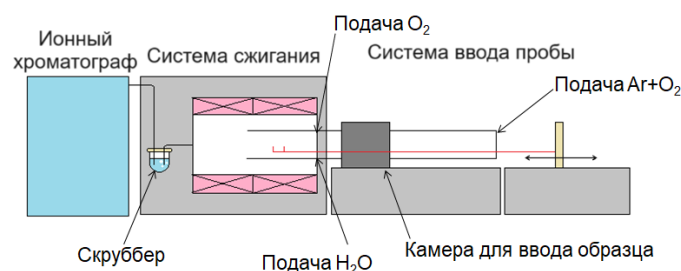
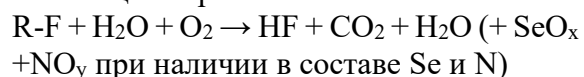


Рис. 1. Схематичное устройство ионного хроматографа с системой сжигания
Fig. 1. Schematic diagram of an ion chromatograph with a combustion system

раствором скруббера, который представляет собой стеклянный сосуд объемом 20 см³, заполненный деионизованной водой. Полученный раствор автоматически поступал в ионный хроматограф. Общее время анализа, включающее стадию сжигания и определения фтора на ионном хроматографе, составляло 20 минут. Схема прибора представлена на рис. 1. Стадии работы системы сжигания представлены в таблице 2. Рабочие параметры системы сжигания и ионного хроматографа представлены в таблице 3.

Реакция горения:



Обсуждение результатов

Рабочие параметры системы сжигания были выбраны в соответствии с рекомендациями производителя для анализа образцов органических соединений (в частности, нефтепродуктов). Условия ионно-хроматографического анализа подобраны таким образом, чтобы добиться оптимального разрешения (степень разрешения $R_s > 1$) пиков фторидов и других анионов, которые могут присутствовать в пробе. Кроме того, в подобранных условиях в перспективе возможно определение и других анионов.

Таблица 2. Стадии работы системы сжигания

Table 2. Operation stages of combustion system

Время, мм:сс	Стадия
00:00	Наполнение скруббера деионизованной водой
01:40	Начало стадии сжигания, подача деионизованной воды в пиротрубку
02:45	Ввод пробы в печь
06:10	Обратный ход лодочки из печи, прекращение подачи деионизованной воды в пиротрубку
06:55	Подача пробы на ионный хроматограф
07:35	Запуск анализа на ионном хроматографе, подача оставшегося раствора на слив
08:00	Промывание системы (2 цикла)
20:00	Конец работы

Таблица 3. Условия анализа

Table 3. Analysis conditions

Система сжигания	
Температура печи, °С	1050
Скорость потока Ar (носитель), см ³ /мин	115
Скорость потока O ₂ (в пиротрубку), см ³ /мин	450
Скорость потока O ₂ (носитель), см ³ /мин	30
Время стадии сжигания, мин	5
Ионный хроматограф	
Элюент (режим элюирования)	20 мМ КОН (изократический)
Скорость потока элюента, см ³ /мин	0.350
Температура термостата колонки, °С	30
Детектор	кондуктометрический с подавлением фонового сигнала
Объем петли, мкл	25
Время анализа, мин	12

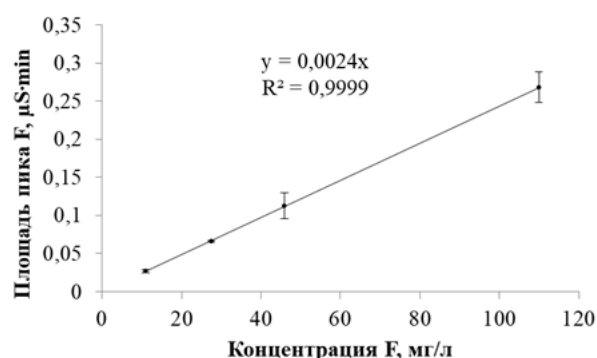


Рис. 2. Градуировочная зависимость, диапазон концентраций F 10-110 мг/дм³

Fig. 2. Calibration curve, concentration range F 10 – 110 mg/l

Градуировочную зависимость строили путем анализа растворов пентафторбензойной кислоты в этаноле. Градуировочные растворы проходили те же стадии анализа, что и исследуемые образцы, что позволило учесть разбавление проб в процессе сжигания. Раствор пентафторбензойной кислоты с содержанием фтора

50 и 110 мг/дм³ готовили путем растворения соответствующей навески в 10 см³ этанола, растворы с содержанием фтора 10 и 25 мг/дм³ готовили разбавлением раствора 110 мг/дм³. Полученная градуировочная зависимость представлена на рис. 2. Аналитическая область 10-110 мг/дм³ F,

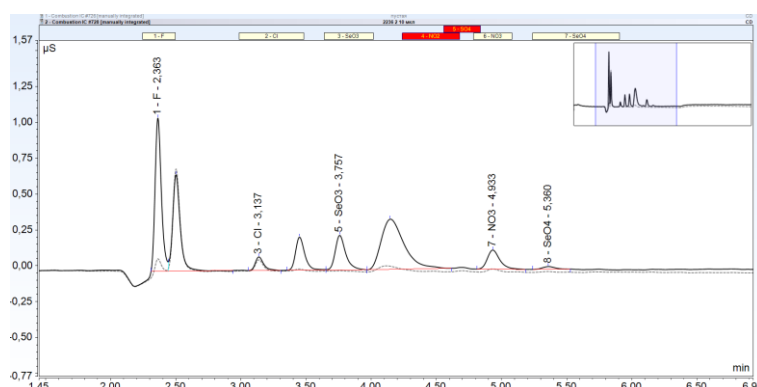


Рис. 3. Хроматограммы, полученные при анализе соединения **2** (черная сплошная) и холостого опыта (серая пунктирная)

Fig. 3. Chromatograms obtained from the analysis of compound **2** (solid black) and a blank experiment (dotted gray)

Таблица 4. Результаты определения фтора в исследуемых соединениях (P=0.95)

Table 4. Results of determination of fluorine in the studied compounds

Вещество	%F _{рассчитано}	%F _{найденно}	%F _{среднее}	СКО	ОСКО	Δ _{дов}	Δ _{абс}
4-фторбен- зойная кис- лота	13.56	13.42	13.6	0.225	1.7	±0.2	0.04
		13.73					
		13.68					
		13.86					
		13.24					
		13.54					
1	8.79	9.04	8.9	0.234	2.6	±0.2	0.11
		8.47					
		9.06					
		9.08					
		9.00					
		8.84					
2	17.35	17.22	17.4	0.258	1.5	±0.3	0.05
		17.76					
		17.13					
		17.67					
		17.42					
		17.24					
3	52.96	52.74	52.74	-	-	-	0.22
4	53.50	53.68	53.68	0.050	0.09	±0.12	0.18
		53.73					
		53.63					
5	59.35	59.81	59.5	0.310	0.52	±0.8	0.15
		59.25					
		59.30					

градуировочный график линеен в этой области. Уравнение градуировочной зависимости $S(\mu\text{S}\cdot\text{min}) = 0.0024 C(\text{мг}/\text{дм}^3)$, коэффициент корреляции $R^2=0.9999$.

Масса навесок зависит от предполагаемого содержания фтора в исследуемом

соединении. В случае высоких содержаний (50% и более) навеска должна быть не более 1-1.5 мг, чтобы полученные концентрации фтора находились примерно в середине диапазона градуировочной зависимости и получались воспроизводи-

мые результаты. В случае, когда содержание фтора менее 20%, допустимы навески около 2-3 мг.

В данном исследовании для растворения пентафторбензойной, 4-фторбензойной кислот, а также соединений 1 и 2 использовался этанол, для соединений 3-5 – гексан. Перед использованием данных растворителей проводили их анализ и сравнение с результатом холостого опыта, когда в систему сжигания не вводится никакой образец и она работает вхолостую. Пики фторида в холостом опыте, гексане и этаноле находятся на одном уровне, а значит, предел обнаружения определяется содержанием фтора в холостом опыте, который включает в себя содержание фторида в поглотительном растворе (деионизованная вода), возможные примеси фтора в используемых газах (аргон, кислород), а также фтор, сорбирующийся на внутренних поверхностях пиротрубки и скруббера после анализа образцов с высоким содержанием фтора. Предел обнаружения составляет 0.6 мг/дм³, предел количественного определения – 2.1 мг/дм³. Наиболее близкая к нашей методика определения фтора в жидких нефтепродуктах методом ионной хроматографии сжигания [4] имеет предел обнаружения 0.5 мг/кг, что соотносится с пределом обнаружения нашей методики.

Было проведено определение содержания фтора в пяти исследуемых соединениях, а также в 4-фторбензойной кислоте для оценки правильности анализа. Для каждого из соединений (за исключением соединения 3 ввиду недостаточного количества вещества, предоставленного для анализа) проводилось по 3-6 параллельных определений. Примеры полученных хроматограмм представлены на рис. 3.

Список литературы/References

1. Politanskaya L.V. *Uspekhi khimii*, 2019. 88(5): 425-569. <https://doi.org/10.1070/RCR4871> (In Russ.)

Результаты количественного определения представлены в таблице 4, они согласуются с рассчитанными значениями содержания фтора. Аттестованное значение фтора в 4-фторбензойной кислоте попадает в доверительный интервал, следовательно, никаких систематических погрешностей не наблюдается. Прецизионность оценивалась относительным стандартным отклонением 3-6 результатов анализа образцов на трех уровнях содержания – 8.79, 17.35 и 59.35%. Относительное стандартное отклонение находилось в диапазоне 0.09-2.6%.

Заключение

Представленные в работе результаты демонстрируют успешное применение метода ионной хроматографии сжигания для определения фтора в основном составе ряда фторорганических соединений с точностью, удовлетворяющей требованиям элементного органического анализа. Рассчитанный предел обнаружения фтора составил 0.6 мг/дм³, удовлетворительные результаты получены для соединений с содержанием фтора в диапазоне 8-60%, при этом диапазон определяемых содержаний можно легко варьировать, меняя массу навесок для приготовления растворов проб или же анализируя твердое вещество без растворения. Возможности данного метода позволяют расширить его применение для определения и других гетероэлементов (Cl, Br, I, S, Se) как по отдельности, так и одновременно.

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.

2. Oliveira D.K., Andriolli C.R., Silva T.R., Cauduro V.H., Moraes Flores E.L., Picoloto R.S., Moraes Flores E.M. *Talanta*, 2025; 293: 128080. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128080>

3. Ignacio M.C.C.D., Curtzwiler G.W., Early M.R., Updegraff K.M., Vorst K.L.,

Methods and Protocols, 2023; 6(1): 10.
<https://doi.org/10.3390/mps6010010>

4. Gazulla M.F., Rodrigo M., Ventura M.J., Andreu C., Orduña M. *Results in Chemistry*, 2021; 3: 100235. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100235>

5. Gehrenkemper L., Simon F., Roesch P., Fischer E., von der Au M., Pfeifer J., Cossmer A., Wittwer P., Vogel C., Simon F.G., Meermann B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021; 413(1): 103-115. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03010-y>

6. Kuz'mina T.G., Romashova T.V., Troneva M.A., Khokhlova I.V. *Journal of Analytical Chemistry*, 2023; 78(8): 975-979. <https://doi.org/10.1134/S1061934823080117>

7. Akhdhar A., Schneider M., Orme A., Schultes L., Raab A., Krupp E.M., Benskin J.P., Welz B., Feldmann J. *Talanta*, 2020; 209: 120466. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120466>

8. Li Q., Zhang W., Tang Z., Liu K., Zhu C., Zhou R., Liu K., Li X. Determination of fluorine content in rocks using laser-induced breakdown spectroscopy assisted with radical synthesis, *Talanta*, 2021; 234: 122712. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122712>

9. Tikhova V.D., Fadeeva V.P., Nikulicheva O.N., Dobrinskaya T.A., Deryabina Yu.M., *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*, 2022. 30(6): 660-673. <https://doi.org/10.15372/khur2022427> (In Russ.)

10. GOST R 57033-2016. Nefteprodukty zhidkie. Opredelenie sledovykh kolichestv khloridov, fluoridov i bromidov metodom ionnoi khromatografii so szhiganiem obraztsa (CIC). Moskva, Standartinform, 2019, 26 p. (In Russ.)

11. Abercron E., Falk S., Stahl T., Georgii S., Hamscher G., Brunn H., Schmitz F. *Science of the Total Environment*, 2019; 673: 384-391. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.068>

Информация об авторах / Information about the authors

С.Ю. Петракова – аспирант НИОХ СО РАН, младший научный сотрудник лаборатории микроанализа НИОХ СО РАН, Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: petrakova@nioch.nsc.ru

В.Д. Тихова – к.х.н., заведующий лабораторией микроанализа НИОХ СО РАН, Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: tikhova@nioch.nsc.ru

S.Yu. Petrakova – postgraduate student of the Institute of Organic Chemistry SB RAS, junior researcher of the Laboratory of microanalysis of the Institute of Organic Chemistry SB RAS, N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: petrakova@nioch.nsc.ru

V.D. Tikhova – PhD, Head of the Microanalysis Laboratory of the Institute of Organic Chemistry SB RAS, N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: tikhova@nioch.nsc.ru

Статья поступила в редакцию 13.08.2025; одобрена после рецензирования 19.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 13.08.2025; approved after reviewing 19.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.582.22, 544.582.3, 543.544.5.068.7

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13420

Выделение иттрия-90 на твердофазных экстрагентах для синтеза терапевтических радиофармацевтических препаратов

Ирина Андреевна Большакова, Антон Алексеевич Ларенков[✉]

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия, alarenkov@fmbcfmba.ru[✉]

Аннотация. Иттрий-90 является одним из перспективных генераторных радионуклидов, используемых в терапевтических целях. В настоящее время важнейшим аспектом разработки препаратов на основе иттрия-90 является достижение высокой радионуклидной чистоты. Данное исследование посвящено разработке способа получения высокочистых растворов иттрия-90 из смеси с материнским радионуклидом стронцием-90 (генератор $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) методом твердофазной экстракции. Для получения твердофазного экстрагента было проведено импрегнирование оригинальной полимерной матрицы OASIS-HLB ди(2-этилгексил)фосфорной кислотой. Изучены сорбционные характеристики HLB-HDEHP и коммерчески доступного твердофазного экстрагента TK221 в статических условиях – определены массовые коэффициенты распределения радионуклидов (D_g) в солянокислых средах. Полученные данные подтвердили пригодность использования твердофазного экстрагента HLB-HDEHP для разделения пары $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$. В статических условиях наблюдали высокую сорбцию иттрия-90 в слабокислых средах ($<0.3 \text{ M HCl}$), в то время как стронций-90 не сорбировался на смолу во всем диапазоне концентраций. Для TK221 была продемонстрирована эффективная сорбция иттрия-90 при концентрации соляной кислоты от 2 М и выше. Результаты показали возможность применения твердофазного экстрагента TK221 в качестве второй ступени разделения. При проведении экспериментов в динамическом режиме десорбция иттрия-90 раствором 5.0 М HCl с HLB-HDEHP составила $94 \pm 4\%$. При элюировании TK221 0.1 М HCl наибольший выход иттрия-90 составил $91 \pm 4\%$. Показано, что использование в качестве элюентов для TK221 1 М натрий-ацетатного буферного раствора (pH 4.5) и 1 М раствора ацетата аммония неэффективно для десорбции иттрия-90. На основании полученных результатов предложена технология последовательного разделения смеси $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ на колонках с HLB-HDEHP и TK221. Выход целевого радионуклида при данном способе разделения достигает 91 %. Радионуклидную примесь стронция-90 в готовых растворах контролировали методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии, по результатам которой установлена допустимая Фармакопеей примесь материнского радионуклида ($<0.001\%$). Произведена оценка пригодности получаемых по разработанному способу растворов иттрия-90 для синтеза радиофармацевтических препаратов. На примере векторных молекул DOTA-TATE и PSMA-617 была показана высокая эффективность инкорпорирования радионуклида в структуру молекул – радиохимическая чистота препаратов составила более 98% по результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: иттрий-90, разделение радионуклидов, твердофазная экстракция, радиофармацевтические препараты, ВЭЖХ

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России, НИОКТР 125022502879-3

Для цитирования: Большакова И.А., Ларенков А.А. Выделение иттрия-90 на твердофазных экстрагентах для синтеза терапевтических радиофармацевтических препаратов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 705-714. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13420>

Original article

Isolation of yttrium-90 on solid-phase extractants for the synthesis of therapeutic radiopharmaceuticals

Irina A. Bolshakova, Anton A. Larenkov[✉]

Burnazyan Federal Medical Biophysical Centre, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation, alarenkov@fmbcfmba.ru[✉]

Abstract. Yttrium-90 is a promising radionuclide generator used for therapeutic purposes. At present, the most important aspect of the development of yttrium-90-based drugs is the achievement of a high radionuclidic purity. This study is aimed at developing a method for the production of high-purity yttrium-90 solutions from a mixture with the parent radionuclide, strontium-90 ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ generator) by solid-phase extraction. To obtain a solid-phase extractant, the original polymer matrix OASIS-HLB was impregnated with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid. The sorption characteristics of HLB-HDEHP and commercially available solid-phase extractant TK221 were studied under static conditions: the mass distribution coefficients of radionuclides (D_g) in hydrochloric acid media were determined. The obtained data confirmed that the HLB-HDEHP solid-phase extractant could be used for $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ separation. Under static conditions, there was high sorption of yttrium-90 in weak acidic media (<0.3 M HCl), while strontium-90 did not adsorb onto the resin over the entire concentration range. In the case of TK221, effective adsorption of yttrium-90 was achieved at the concentrations of hydrochloric acid of 2 M and above. According to the results of the study it is possible to use TK221 solid-phase extractant for the second stage of separation. When experiments were conducted in a dynamic mode, the desorption of yttrium-90 with a solution of 5.0 M HCl with HLB-HDEHP was $94 \pm 4\%$. During TK221 elution with 0.1 M HCl, the highest yield of yttrium-90 was $91 \pm 4\%$. It was shown that using 1 M sodium acetate buffer solution (pH 4.5) and 1 M ammonium acetate solution as eluents for TK221 is ineffective for the desorption of yttrium-90. The results of the experiment allowed us to propose a technology for sequential separation of a $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ mixture in columns with HLB-HDEHP and TK221. The yield of the target radionuclide by this separation method reached 91%. The radionuclide impurity of strontium-90 in the prepared solutions was monitored by liquid scintillation counting, which allowed determining the allowable Pharmacopoeia impurity of the parent radionuclide ($<0.001\%$). We assessed the suitability of yttrium-90 solutions obtained by the developed method for the synthesis of radiopharmaceuticals. Using the example of the DOTA-TATE and PSMA-617 vector molecules, it was shown that incorporating the radionuclide into the structure of molecules is highly effective: according to the results of high-performance liquid chromatography the radiochemical purity of the preparations was over 98%.

Keywords: yttrium-90, separation of radionuclides, solid-phase extraction, radiopharmaceuticals, HPLC

Acknowledgments: the work was carried out with the financial support of the FMBA of Russia, R&D Center 125022502879-3.

For citation: Bolshakova I.A., Larenkov A.A. Isolation of yttrium-90 on solid-phase extractants for the synthesis of therapeutic radiopharmaceuticals. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 705-714. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13420>

Введение

Направленная радионуклидная терапия – один из перспективных методов лечения злокачественных опухолей [1], который позволяет минимизировать радиационную нагрузку на весь организм по сравнению с использованием внешней лучевой терапии. Иттрий-90 является одним из ключевых терапевтических радионуклидов, используемых сегодня в мировой клинической практике [2]. Ядерно-физические характеристики радионуклида определяют его применение в терапии: иттрий-90 имеет короткий период полураспада равный 64.2 часам, испускает высокоэнергетическое β^- излучение с максимальной энергией – 2.28 МэВ.

Главной задачей для успешного и безопасного клинического применения препаратов, синтезируемых на основе иттрия-90, является необходимость дости-

жения высокой радионуклидной чистоты. В соответствии с фармакопейными стандартами примесь стронция-90 в растворах иттрия-90 для синтеза радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП) должна составлять не более 0.002% [3], поскольку стронций-90, являясь аналогом кальция, имеет свойство накапливаться в костной ткани и приводит к существенным дозовым нагрузкам на костный мозг. Поэтому особое внимание уделяется методам получения препаратов иттрия-90 высокой радиохимической и радионуклидной чистоты.

Теоретическая часть

Для получения короткоживущих радионуклидов в медицинских и исследовательских учреждениях наиболее перспективными представляются методы, основанные на принципе работы радиоизо-

топных генераторов, позволяющие отделять короткоживущие радионуклиды от более долгоживущих материнских.

Особенно эффективными для разделения генераторной пары $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ являются методы ионообменной и экстракционной хроматографии. Катионообменные смолы применяют как для загрузки генераторов, так и для последующей очистки элюатов. Так, в работе [4] представлена система разделения, состоящая из трех последовательно соединенных колонок со смолой Dowex 50 W X8 и колонки со смолой AG 50-WX12. Генераторы элюировали 6 mM раствором ЭДТА (pH 4.5), затем иттрий-90 переводили в 0.1 M HCl и проводили очистку на AG 50-WX12. На выходе получали раствор иттрия-90 в 0.01 M HCl с выходом более 95 % и примесью стронция-90 на уровне $10^{-7}\%$. Катионит AG 50-WX16 в качестве загрузочного сорбента в тандеме генератор-очистка при элюировании 0.5 M ацетатом натрия (pH 5.0) снизил примесь стронция-90 в продукте до $10^{-5}\%$, эффективность элюирования иттрия-90 составила более 90% [5].

Классическим экстрагентом для разделения пары $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ является 0.3 M ди(2-этилгексил)фосфорная кислота (Д2ЭГФК, HDEHP) в додекане. Д2ЭГФК используют как в методе жидкостной экстракции, так и в методе твердофазной экстракции для импрегнирования полимеров. Жидкостная экстракция – эффективный способ разделения $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, при котором выход иттрия-90 составляет более 90 %, а радионуклидная примесь стронция – не более 0.002% [6]. Однако широкое применение жидкостной экстракции ограничивается сложной многоступенчатой процедурой и образованием большого количества жидких отходов. При этом методика твердофазной экстракции сочетает в себе сразу несколько преимуществ жидкостной экстракции и ионного обмена, такие как высокие скорости массопереноса целевых ионов, высокие ко-

эффициенты распределения и селективности, а также простота операций колонной хроматографии. Авторы [7] сравнивали смолы, импрегнированные 0.3 M Д2ЭГФК в додекане и 1 M n-октил(фенил)-N,N-диизобутилкарбамоил-метилфосфиноксидом (СМРО) в три-н-бутилфосфате (ТБФ), с коммерчески доступными твердофазными экстрагентами (ТФЭ) – Sr-resin и RE-resin на основе 4,4'(5')-ди-трет-бутилциклогексано-18-краун-6 в октанолe и 1 M СМРО в ТБФ, соответственно. Результаты последовательного выделения иттрия-90 на колонках с Д2ЭГФК/додеканом и СМРО/ТБФ показали более низкий выход иттрия-90 (>75%) по сравнению с аналогичной схемой разделения на колонках с Sr-resin и RE-resin (>83%), тем не менее содержание примеси стронция-90 было приемлемым для приготовления РФЛП. В некоторых случаях при разделении $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ с помощью ТФЭ на основе Д2ЭГФК прибегают к дополнительной очистке растворов иттрия-90 с помощью комбинации колонок с твердофазными экстрагентами и ионообменными смолами. Так, в работе [8] выход иттрия-90 при таком способе получения достигал до 72%, а доля активности стронция-90 в продукте составляла 1.08×10^{-8} .

Стоит отметить, что одним из достоинств использования ТФЭ на основе Д2ЭГФК является доступность полимерной матрицы и экстрагента, в отличие от дорогостоящей смолы Sr-resin, а также простая методика импрегнирования.

В настоящей работе предложен способ получения высокочистых растворов иттрия-90 методом твердофазной экстракции на основе фосфорорганических экстрагентов. Для выделения иттрия-90 из смеси $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ было решено исследовать пригодность оригинальной смолы HLB (OASIS Waters, США), представляющей собой макропористый сополимер липофильного дивинилбензола и гидрофильного N-винилпирролидона. Этот сорбент

обладает уникальной способностью сохранять смачиваемость водой и удерживать широкий спектр неполярных органических экстрагентов. Смола HLB, импрегнированная Д2ЭГФК, ранее показала высокую эффективность для выделения лютеция-177 для синтеза радиофармпрепаратов [9].

В работе также был исследован коммерчески доступный твердофазный экстрагент ТК221 (TrisKem International, Франция). Он представляет собой инертный полимер, импрегнированный смесью дигликольамида и фосфиноксида. По данным производителя, иттрий-90 эффективно извлекается ТК221 из концентрированной солянокислой среды (≥ 2 М HCl) [10], что позволяет применять данную смолу для его получения.

В рамках разработки технологии разделения смеси $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ было изучено сорбционное поведение радионуклидов на ТФЭ. Определена примесь стронция-90 в готовом продукте иттрия-90. Исследована пригодность получаемых растворов иттрия-90 для синтеза РФЛП.

Экспериментальная часть

В работе применяли реактивы класса особо чистых производства SigmaAldrich (США), Panreac (Испания), а также деионизованную воду 18.2 МОм \times см. Использовали раствор стронция-90 в 0.05 М HCl активностью 1 ГБк/см³ производства АО В/О «Изотоп». Импрегнирование матрицы OASIS-HLB проводили путем упаривания навески смолы с Д2ЭГФК в среде метанола по методике, описанной в работе [9].

Измерение объемной активности проводили с использованием дозкалибратора ISOMED 2010 (PTW, Германия). Выход иттрия-90 и коэффициенты распределения измеряли по тормозному излучению с помощью автоматического γ -счетчика Wizard 2480 (PerkinElmer, США). Измерение примеси стронция-90 в готовом растворе иттрия-90 было выполнено с помощью спектрометрического радиометра альфа/бета излучения Quantulus 1220

(PerkinElmer Life Sciences/Wallac Oy, Финляндия) методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии (ЖСС). Для радиометрического детектирования хроматографических полосок использовали сканер для тонкослойной радиохроматографии miniGita Star (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Германия).

Первичное выделение иттрия-90 было произведено методом жидкостной экстракции из раствора $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ в 0.55 М HNO₃. В качестве экстрагента использовали Д2ЭГФК в н-додекане, в качестве реэкстрагента – 5 М HCl. Концентрацию экстрагента и величину соотношения фаз выбирали на основе методики авторов работы [6]. Дополнительно реэкстракт очищали на силикагеле для удаления остатков органической фазы. По завершению процесса получали 1 мл раствора иттрия-90 в 0.05 М HCl.

Сорбционное поведение стронция-90 и иттрия-90 на ТФЭ было изучено путем определения коэффициентов распределения (D_g) в статических условиях. Сорбцию радионуклидов осуществляли из растворов соляной кислоты. Массовые коэффициенты распределения определяли по формуле:

$$D_g = \frac{A_0 - A_s}{A_s} \cdot \frac{V}{m} \quad (1)$$

где A_0 – активность сорбционного раствора; A_s – активность жидкой фазы после сорбции; V – объем жидкой фазы; m – масса сорбента.

Разделение пары $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ в динамических условиях проводили с использованием хроматографических колонок РЕЕК 50 мм \times \varnothing 2.1 мм (VICI Jour, Швейцария). Одну колонку загружали смолой HLB-HDENP (73-75 мг на колонку), другую – смолой ТК221 (64-66 мг на колонку). Заполненные колонки закрывали полиэтиленовыми фриттами в РЕЕК-оболочке и переходниками 1/4–28 (Luer РЕЕК). Объем сорбционных растворов и элюентов на всех этапах разделения составлял 1 см³.

Полученные по разработанному методу растворы иттрия-90 в 0.01 М HCl были

использованы для приготовления радиофармпрепаратов. Для мечения были выбраны векторные молекулы DOTA-TATE и PSMA-617 (ABX, Германия), а также новый лиганд FAP-2286 (Jenguro, Россия). Синтез проводили в пробирках типа Эппендорф (TermoFisher, США) объемом 1.5 см³ на термостатируемом шейкере (Bioer MB-102, Китай) при температуре 95°C в течение 30 минут. pH реакционных смесей доводили 1 М натрий-ацетатным буфером до значения 4.5.

Связывание иттрия-90 в комплекс с векторными молекулами оценивали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). За радиохимическую чистоту (РХЧ) препаратов принимали разницу между 100 % и содержанием радиохимических примесей. При определении радиохимической чистоты препаратов (⁹⁰Y]Y-DOTATATE, [⁹⁰Y]Y-PSMA-617, [⁹⁰Y]Y-FAP-2286) методом ТСХ в качестве неподвижной фазы использовали полоски из стекловолокна, импрегнированного силикагелем (iTLC-SG, Aglient Technologies, Inc., США). Для анализа применяли две хроматографические системы: 50 мМ раствор лимонной кислоты (фактор удерживания (Rf) <0.1 для меченного комплекса, 0.67 < Rf < 1 – для свободного радионуклида) и 1 М раствор ацетата аммония, растворенный в равных объемах метанола и воды (Rf >0.73 для меченного комплекса, Rf <0.1 – для свободного радионуклида).

Для ВЭЖХ комплексов иттрия-90 с DOTA-TATE и PSMA-617 использовался разработанный ранее метод анализа для DOTA-конъюгированных молекул в градиентном режиме [11]. Анализ проводили с помощью хроматографа LicArt-62 (ООО «Лабконцепт», Россия), оснащенного спектрофотометрическим диодно-матричным детектором и проточным детектором радиоактивности GABI Nova basic (Elysia-raytest, Germany). Хроматографическое разделение проводили на колонке Phenomenex® Luna 150×Ø3 мм,

5 мкм, 100 Å при 30°C, скорость потока 1 см³/мин, программа градиентного элюирования 0-5-15-20 мин = 17-25-25-17% В, где А – водный раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) 0.1 об.%; В – раствор ТФУ в ацетонитриле 0.1 об.%. Для комплекса [⁹⁰Y]Y-FAP-2286 использовали программу градиентного элюирования с использованием цитратного буферного раствора: 0-3-15-25-28 мин = 5-5-30-30-5% В, где А – 50 мМ цитратный буферный раствор (pH 5.6); В – ацетонитрил. Разделение проводили на колонке Phenomenex® Luna 150×Ø4 мм, 5 мкм, 100 Å при 30°C, скорость потока 1 см³/мин. Экспериментальные данные в работе были получены путем проведения не менее трех параллельных измерений.

Обсуждение результатов

С целью оценки возможности разделения пары ⁹⁰Sr/⁹⁰Y на ТФЭ было изучено сорбционное поведение данных радионуклидов. Для этого было произведено первичное выделение иттрия-90 из равновесной смеси ⁹⁰Sr/⁹⁰Y методом жидкостной экстракции 0.25 М ДЭГФК в н-додекане.

Значения коэффициентов распределения иттрия-90 и стронция-90 на HLB-HDEHP были получены в диапазоне концентраций HCl от 0.02 до 6.0 моль/дм³, на ТК221 – от 0.01 до 5.0 моль/дм³.

Результаты исследования коэффициентов распределения в статических условиях показывают высокую сорбцию иттрия-90 на смоле HLB-HDEHP до 0.2 М HCl (таблица 1). Максимального значения D_g(⁹⁰Y) достигает в 0.05 М HCl и составляет (15.0±1.0)×10⁴ см³/г. С повышением концентрации соляной кислоты сорбция иттрия-90 стремительно уменьшается, в растворах с концентрацией 0.5 М и выше сорбция практически отсутствует. При этом стронций-90 практически не сорбируется на смолу во всем диапазоне концентраций (D_g(⁹⁰Sr) < 20 см³/г). Это свидетельствует о пригодности использования твердофазного экстрагента

Таблица 1. Значения массовых коэффициентов распределения иттрия-90 и стронция-90 на твердофазном экстрагенте HLB-HDEHP в солянокислой среде

Table 1. Values of mass distribution coefficients of yttrium-90 and strontium-90 on the HLB-HDEHP solid-phase extractant in a hydrochloric acid medium

Концентрация HCl в образце, моль/дм ³	$D_g(^{90}\text{Y})$, см ³ /г	$D_g(^{90}\text{Sr})$, см ³ /г
0.02	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^4$	6.2 ± 2.8
0.05	$(15.0 \pm 1.0) \times 10^4$	9.3 ± 5.1
0.1	$(3.5 \pm 1.1) \times 10^4$	5.5 ± 2.1
0.2	$(3.72 \pm 0.02) \times 10^3$	9.3 ± 5.3
0.3	682 ± 66	9.2 ± 4.7
0.4	312 ± 47	15.3 ± 7.1
0.5	157 ± 30	12.8 ± 6.8
0.6	161 ± 21	10.0 ± 6.1
0.7	101 ± 32	16.6 ± 7.3
0.8	91 ± 10	8.9 ± 4.0
0.9	56 ± 14	7.1 ± 2.6
1.0	63 ± 17	8.2 ± 3.4
2.0	23.6 ± 6.8	9.2 ± 4.9
3.0	9.6 ± 4.3	10.3 ± 5.5
4.0	19.3 ± 5.9	5.4 ± 1.7
5.0	27.3 ± 4.7	6.6 ± 2.9
6.0	27.2 ± 4.8	9.8 ± 4.5

HLB-HDEHP для разделения пары $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$.

Изучено сорбционное поведение иттрия-90 на экстрагенте ТК221. Полученные коэффициенты распределения (таблица 2) коррелируют с данными производителя [10] и показывают высокую сорбцию иттрия-90 на смоле в сильноокислых средах (≥ 2 М HCl). В 5.0 М соляной кислоте $D_g(^{90}\text{Y})$ достигает значения $(39.0 \pm 7.0) \times 10^4$ см³/г. Результаты экспериментов в статических условиях показывают возможность применения твердофазного экстрагента ТК221 в качестве второй ступени разделения для очистки растворов иттрия-90 от следовых количеств стронция-90. Кроме того, данная смола позволяет проводить конверсию растворов иттрия-90 в слабоокислую среду без разбавления, что необходимо для дальнейшего мечения.

Исходя из результатов исследования коэффициентов распределения были проведены эксперименты в динамическом режиме. Для колонки с HLB-HDEHP

наблюдали высокую сорбцию и десорбцию иттрия-90. При элюировании 5.0 М HCl выход иттрия-90 с данной смолы составил $94 \pm 4\%$. Для элюирования иттрия-90 со смолы ТК221 была выбрана 0.05 М HCl, выход иттрия-90 при этом составил $86 \pm 5\%$. В поисках более оптимальных условий десорбции также была оценена пригодность натрий-ацетатного буфера (pH 4.5), так как ранее данный элюент показал высокую эффективность десорбции для скандия-44 с ТК221 [12]. В случае с иттрием-90 был выбран 1 М натрий-ацетатный буфер (pH 4.5) (таблица 3). При повторе эксперимента в динамических условиях полученный элюат (1 см³ ^{90}Y в 1 М натрий-ацетатном буфере) обладал очень низкой объемной активностью (7% от активности на колонке). Такие же результаты получены при элюировании ТК221 раствором 1 М ацетата аммония. Поэтому было решено остановить поиски элюента на подборе оптимальной концентрации соляной кислоты.

Таблица 2. Значения массовых коэффициентов распределения иттрия-90 на твердофазном экстрагенте ТК221 в солянокислой среде

Table 2. Values of mass distribution coefficients of yttrium-90 on the TK221 solid-phase extractant in a hydrochloric acid medium

Концентрация HCl в образце, моль/дм ³	$D_g(^{90}\text{Y})$, см ³ /г
0.01	8.2±2.7
0.05	11.8±1.8
0.1	9.3±1.1
0.5	2.8±3.9
1.0	19.7±3.2
2.0	920.8±9.8
3.0	(1.0±0.1)×10 ⁴
4.0	(13±4)×10 ⁴
5.0	(39±7)×10 ⁴

Таблица 3. Значения массовых коэффициентов распределения иттрия-90 на твердофазном экстрагенте ТК221 в среде натрий-ацетатного буфера

Table 3. Values of mass distribution coefficients of yttrium-90 on the TK221 solid-phase extractant in a sodium acetate buffer medium

Концентрация натрий-ацетатного буфера, моль/дм ³	$D_g(^{90}\text{Y})$, см ³ /г
0.1	126.3±2.7
0.3	47.1±2.9
0.5	27.8±2.1
0.7	21.4±1.9
1.0	19.3±1.7

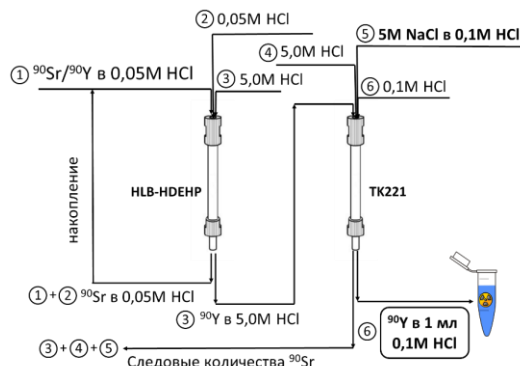


Рис.1. Схема разделения генераторной пары ⁹⁰Sr/⁹⁰Y на твердофазных экстрагентах HLB-HDEHP и ТК221

Fig. 1. Separation scheme of the ⁹⁰Sr/⁹⁰Y generator pair on the HLB-HDEHP and TK221 solid-phase extractants

С подобной проблемой сталкивались авторы работы [12] при десорбции скандия-44 с ТК221. Высокий выход для скандия-44 (90%) показало элюирование 0.1 М HCl с предварительной промывкой колонки раствором 5 М NaCl в 0.1 М HCl. Поэтому в дальнейших экспериментах для десорбции иттрия-90 с ТК221 использовали 0.1 М HCl, для которой характерен низкий коэффициент распределения радионуклида. В таких условиях

средний выход иттрия-90 с ТК221 в 1 мл 0.1 М HCl составил 91% (таблица 4).

На основании данных экспериментов в статических и динамических условиях была предложена схема последовательного выделения иттрия-90 из смеси ⁹⁰Sr/⁹⁰Y в 0.05 М HCl на твердофазных экстрагентах (рис. 1). Технология предусматривает разделение смеси ⁹⁰Sr/⁹⁰Y на первой колонке с HLB-HDEHP и очистку раствора иттрия-90 на колонке с ТК221.

Таблица 4. Результаты выделения иттрия-90 на твердофазных экстрагентах
Table 4. Results of yttrium-90 isolation on solid-phase extractants

№ серии	Активность исходного раствора $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, МБк	Выход ^{90}Y с колонок HLB- HDEHP, %	Выход ^{90}Y с колонок TK221, %	Общий вы- ход ^{90}Y , %	Примесь ^{90}Sr в конечном рас- творе ^{90}Y , %
1	13.51	99.8	83.3	83.1	$<1 \times 10^{-3}$
2	9.11	98.9	89.0	87.9	
3	94.96	89.8	92.2	82.8	
4	15.86	95.5	95.3	91.0	
5	67.61	91.4	92.1	84.2	
6	9.3	91.2	93.5	85.3	

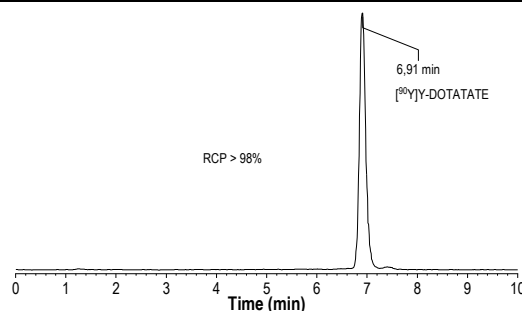


Рис. 2. Хроматограмма препарата $[^{90}\text{Y}]\text{Y-DOTA-TATE}$
Fig. 2. Chromatogram of the $[^{90}\text{Y}]\text{Y-DOTA-TATE}$ preparation

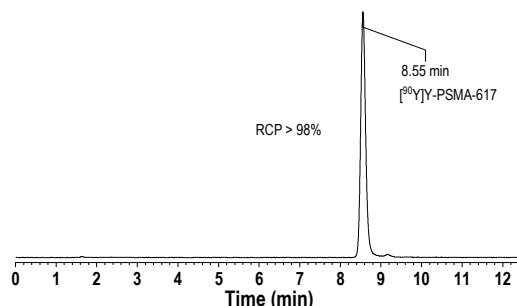


Рис. 3. Хроматограмма препарата $[^{90}\text{Y}]\text{Y-PSMA-617}$
Fig. 3. Chromatogram of the $[^{90}\text{Y}]\text{Y-PSMA-617}$ preparation

Для каждой колонки после сорбции радионуклида предусмотрен этап промывки для удаления радионуклидной примеси стронция-90. Дополнительная промывка колонки с ТК221 раствором 5 М NaCl в 0.1 М HCl позволяет избавиться от остаточной кислотности в колонке без потери целевого изотопа и закисления финального раствора иттрия-90, что благоприятно сказывается на дальнейшем процессе мечения.

Особое внимание было уделено измерению радионуклидной примеси материнского стронция-90 в растворах иттрия-90. Методом ЖСС было установлено, что в растворе иттрия-90 в 5.0 М HCl, полученном после разделения на HLB-HDEHP,

примесь стронция-90 составляет менее 0.04%. После очистки на ТК221 содержание примеси в готовом растворе иттрия-90 в 0.1 М HCl находится на уровне менее 0.001%. Данные результаты удовлетворяют фармакопейным требованиям, поэтому получаемые растворы иттрия-90 в дальнейшем были применены для синтеза РФЛП.

Эксперименты по мечению проводили на примере DOTA-конъюгированных лигандов DOTA-TATE, PSMA-617 и FAP-2286. РХЧ препаратов $[^{90}\text{Y}]\text{Y-DOTA-TATE}$ (14 нмоль/см³) и $[^{90}\text{Y}]\text{Y-PSMA-617}$ (19.2 нмоль/см³) составляла более 98 % по результатам ВЭЖХ-анализа (рис. 2-3). На

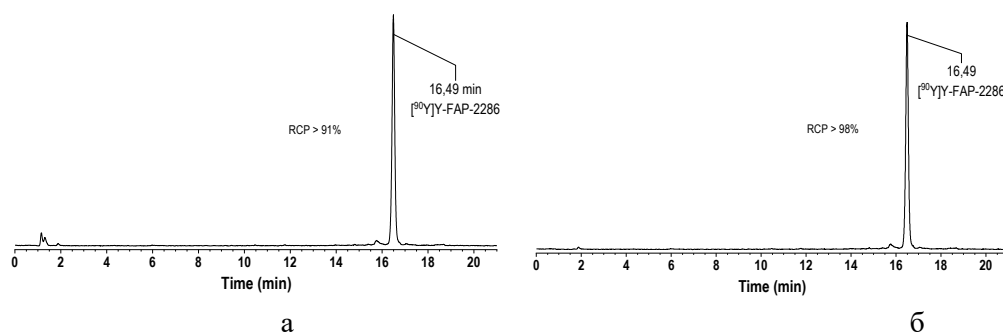


Рис. 4. а – исходный препарат $[^{90}\text{Y}]\text{Y-FAP-2286}$; б – препарат $[^{90}\text{Y}]\text{Y-FAP-2286}$ после очистки

Fig. 4. а – initial $[^{90}\text{Y}]\text{Y-FAP-2286}$ preparation; б – $[^{90}\text{Y}]\text{Y-FAP-2286}$ preparation after purification

хроматограмме комплекса $[^{90}\text{Y}]\text{Y-FAP-2286}$ (13.5 нмоль/см^3) наблюдали примеси в области до двух минут (рис. 4 а), обусловленные наличием примесей в прекурсоре. После очистки на обращенно-фазовом сорбенте С18 (Chromafix С18, Macherey-Nagel) конечное РХЧ составило $>98\%$ (рис. 4б). Для молекулы DOTA-TATE синтез также был проведен при концентрациях DOTA-TATE 3.5 и 7 нмоль/см^3 . Во всех случаях реакция комплексообразования завершилась с выходом $[^{90}\text{Y}]\text{Y-DOTA-TATE}$ более 98% . Высокий показатель РХЧ даже при низких концентрациях прекурсора свидетельствует об отсутствии примесных катионов в растворах иттрия-90 и, как следствие, их пригодности для синтеза РФЛП.

Заключение

В настоящем исследовании разработана технология разделения генераторной пары $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ на твердофазных экстрагентах HLB-HDENP и ТК221. В рамках данной работы подтверждена пригодность оригинальной смолы OASIS-HLB, импрегнированной Д2ЭГФК, для выделения иттрия-90. Полученные экспериментальные данные о сорбционном поведении радионуклидов на твердофазных экстрагентах позволили определить оптимальные условия процесса разделения. Общий выход иттрия-90 в процессе раз-

деления составляет $86 \pm 3\%$ и характеризуется высокой стабильностью, а примесь стронция-90 в готовых растворах ниже регламентируемого Фармакопеей (менее 0.001%).

Преимуществом данной технологии можно отметить возможность получения высокочистых растворов иттрия-90 всего за две стадии разделения и очистки. Кроме того, в системе нет постоянного контакта твердофазного экстрагента с активностью, что значительно уменьшает радиационную нагрузку на твердую фазу.

В работе продемонстрирована высокая эффективность инкорпорирования иттрия-90 из получаемых растворов в структуру DOTA-конъюгированных лигандов. Для препаратов $[^{90}\text{Y}]\text{Y-DOTA-TATE}$, $[^{90}\text{Y}]\text{Y-PSMA-617}$ и $[^{90}\text{Y}]\text{Y-FAP-2286}$ радиохимическая чистота составила более 98% .

Таким образом, получаемые по разработанному способу растворы иттрия-90 обладают высокой радионуклидной и радиохимической чистотой и пригодны для синтеза РФЛП надлежащего качества.

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. Zyryanov S.K., Zatolochina K.E. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*, 2018; 2:51-57. <https://doi.org/10.24411/2588-0519-2018-10044> (In Russ.)
2. Vlasova O.P., Nerozin N.A., Shapovalov V.V., Khamyanov S.V. Preclinical studies of a radiopharmaceutical with ^{90}Y for intraarterial radioembolization of inoperable patients with primary and metastatic liver tumors. Obninsk, SRC-IPPE, 2017.
3. Council of Europe Yttrium (^{90}Y) chloride solution for radiolabelling, European Pharmacopoeia 10 Edition. 2020.
4. Leyva Montaña R., Hernández González I., Alberti Ramirez A., Garaboldi L., Chinol M. *Current Radiopharmaceuticals*, 2012; 5(3): 253-263.
5. Du J., Chinol M., Savonen A., Hiltunen J. *Radiochimica Acta*, 2005; 93(2): 111-113. <https://doi.org/10.1524/ract.93.2.111.59414>.
6. Šrank J., Melichar F., Filyanin A.T., Tome M., Beran M., *Applied Radiation and Isotopes*, 2010; 68(12): 2163-2168. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2010.07.012>
7. Injarean U., Pichestapong P., Sriwiang W., *Chiang Mai Journal of Science*, 2018; 45(1): 556-564.
8. Shapovalov V.V., Mel'nicenko N.A., Nerozin N.A., Tkachev S.V., Togaeva N.R., Kham'yanov S.V., *Radiochemistry*, 2012; 54(4): 388-390. <https://doi.org/10.1134/s1066362212040133>.
9. Le Van So, Morcos N. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2008; 277(3): 651-661. <https://doi.org/10.1007/s10967-007-7131-1>.
10. Khappel Sh. *Triskem Infos*. 2020; 19: 1-4.
11. Larenkov A.A., Mitrofanov Yu.A., Rakhimov M.G. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*, 2022; 12(4): 455-467. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-4-455-467>.
12. Larenkov A.A., Makichyan A.G., Iatsenko V.N. *Molecules*, 2021; 26(21): 6371. <https://doi.org/10.3390/molecules26216371>.

Информация об авторах / Information about the authors

И.А. Большакова – младший научный сотрудник лаборатории технологии и методов контроля радиофармпрепаратов ФГБУ ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна ФМБА России. Москва, Россия, ORCID: 0000-0001-6024-4478, e-mail: iren_bolshakova2000@mail.ru

А.А. Ларенков – к.х.н., зав. отделом радиационных технологий медицинского назначения, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Москва, Россия, ORCID: 0000-0003-4810-4346, mail: alarenkov@fmbcfmba.ru

I.A. Bolshakova – junior researcher of the Laboratory of Radiopharmaceuticals Technology and Control Methods State Research Center–Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia ORCID: 0000-0001-6024-4478, e-mail: iren_bolshakova2000@mail.ru

A.A. Larenkov – Ph.D (chemistry), Head of the Department of Radiation Technologies for Medical Use, State Research Center–Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, ORCID: 0000-0003-4810-4346, mail: alarenkov@fmbcfmba.ru

Статья поступила в редакцию 23.05.2025; одобрена после рецензирования 25.07.2025; принята к публикации 27.07.2025.

The article was submitted 23.05.2025; approved after reviewing 25.07.2025; accepted for publication 27.07.2025.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13426

Синтез и ВЭЖХ/МС-исследование производных 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримиди- нола из растительных масел

Алексей Александрович Кружилин[✉], Иван Александрович Дмитриев,
Михаил Андреевич Потапов, Хидмет Сафарович Шихалиев

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, kruzhilin.alexey@gmail.com[✉]

Аннотация. В работе представлены результаты синтеза и анализа производных 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов, полученных из подсолнечного, пальмового и кокосового масел. Синтетический подход включал стадию получения аминотриазолов и их дальнейшую конденсацию с коричным альдегидом в присутствии амфотерного поверхностно-активного вещества. Для установления состава и структуры реакционных смесей был использован метод ВЭЖХ/МС высокого разрешения с ионизацией электрораспылением. Показано, что распределение целевых продуктов коррелирует с жирнокислотным профилем исходного масла: для подсолнечного масла доминируют производные линолевой кислоты (59.41%), для пальмового – пальмитиновой (52.67%), для кокосового – лауриновой (43.51%). Отмечено присутствие побочных соединений (3-8%), обусловленных неполной циклизацией, автоконденсацией альдегидов, а также спецификой получения 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов без выделения (обусловлено сферой применения данных продуктов в качестве ингибиторов кислотной коррозии стали). Полученные результаты подтверждают перспективность использования возобновляемого растительного сырья для целенаправленного синтеза гетероциклических соединений с потенциальной ингибирующей активностью в отношении кислотной коррозии металлов.

Ключевые слова: ВЭЖХ/МС; жирные кислоты; подсолнечное масло; пальмовое масло; кокосовое масло; триазолопиримидины; производные триазола; зелёная химия; ингибиторы коррозии

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-23-00457, <https://rscf.ru/project/24-23-00457/>).

Для цитирования: Кружилин А.А., Дмитриев И.А., Потапов М.А., Шихалиев Х.С. Синтез и ВЭЖХ/МС-исследование производных 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидинола из растительных масел // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 715-722. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13426>

Original article

Synthesis and HPLC/MS Investigation of 2-Alkyl-5-Phenyl-4,5,6,7-Tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidinol Derivatives from Vegetable Oils

Alexey A. Kruzhilin[✉], Ivan A. Dmitriev, Mikhail A. Potapov, Khidmet S. Shikhaliev

Voronezh state university, Voronezh, Russian Federation, kruzhilin.alexey@gmail.com[✉]

Abstract. This work presents the synthesis and analysis of 2-alkyl-5-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7-ol derivatives obtained from sunflower, palm, and coconut oils. The synthetic approach included the preparation of aminotriazoles followed by their condensation with cinnamaldehyde in the presence of an amphoteric surfactant. The composition and structure of the reaction mixtures were established using

high-resolution HPLC/ESI-MS. It was shown that the distribution of the target products correlates with the fatty acid profile of the starting oil: linoleic acid derivatives dominated in sunflower oil (59.41%), palmitic acid derivatives in palm oil (52.67%), and lauric acid derivatives in coconut oil (43.51%). The presence of side products (3-8%) was observed, attributed to incomplete cyclization, aldehyde self-condensation, and the specifics of obtaining 2-alkyl-5-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7-ols without isolation (motivated by the intended use of these products as acid corrosion inhibitors for steel). The results confirm the potential of using renewable plant-based raw materials for the targeted synthesis of heterocyclic compounds with potential inhibitory activity against metal acid corrosion.

Keywords: HPLC/MS; fatty acids; sunflower oil; palm oil; coconut oil; triazolopyrimidines; triazole derivatives; green chemistry; corrosion inhibitors

Acknowledgments: The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 24-23-00457, <https://rscf.ru/project/24-23-00457/>)

For citation: Kruzhalin A.A., Dmitriev I.A., Potapov M.A., Shikhaliev Kh.S. Synthesis and HPLC/MS Investigation of 2-Alkyl-5-Phenyl-4,5,6,7-Tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidinol Derivatives from Vegetable Oils. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 715-722. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13426>

Введение

В настоящее время увеличение объемов добычи на нефтяных месторождениях является одним из ключевых направлений развития нефтедобывающей промышленности. Особенно перспективными для применения новых технологий интенсификации добычи являются карбонатные коллекторы, где выработка и коэффициент извлечения нефти относительно низки. Среди методов воздействия на призабойную зону скважин в таких коллекторах наиболее распространены солянокислотные технологии, которые играют важную роль в увеличении добычи нефти [1-2]. Однако использование соляной кислоты может вызвать коррозию металлов и растрескивание трубопроводов под напряжением. Для предотвращения этих проблем в раствор соляной кислоты добавляют ингибиторы коррозии. В последнее время усилились исследования по поиску и синтезу экологически чистых и безвредных соединений природного происхождения, которые могут быть использованы в качестве таких антикоррозионных агентов. В качестве подобных добавок используются разнообразные соединения: как органические, так и неорганические [3].

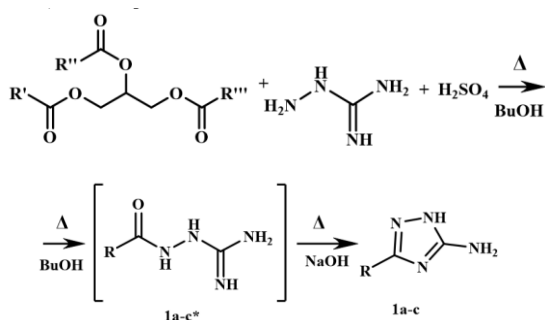
Растительные масла (касторовое, пальмовое, соевое, подсолнечное и др.) служат сырьём для извлечения жирных кислот (олеиновая, стеариновая, линолевая и

др.), которые модифицируются в эффективные ингибиторы. Химическая модификация жирных кислот позволяет получать ингибиторы коррозии таких классов, как сложные эфиры для защиты в HCl и нефтеводных средах, этоксилаты, оксидиазолы/триазоламины и амидоамины, а также аммонийные соли триэтаноламина в качестве ингибиторов кислотных сред (HCl и H₂SO₄), имидазолины для защиты в солевых растворах NaCl. Согласно литературным данным, наряду с высокой антикоррозионной эффективностью, такие ингибиторы обладают рядом преимуществ: они являются биоразлагаемыми, нетоксичными (в сравнении с известными ингибиторами), а их производство более экономично, так как используется возобновляемое сырьё низкой стоимости [4].

В рамках наших предыдущих исследований [5-6] было выявлено неожиданное ингибирующее действие продуктов реакции между 3-алкил-5-амино-1H-1,2,4-триазолами и коричневым альдегидом, проявляющих высокую ингибирующую активность в отношении коррозии стали Ст3 в солянокислой среде. составов смесей 4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-7-олов, получаемых из подсолнечного, пальмового и кокосового масел с применением универсального инструмента для определения состава реакционной смеси – высокоэффективной жидкостной хроматографии в

сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС).

Экспериментальная часть

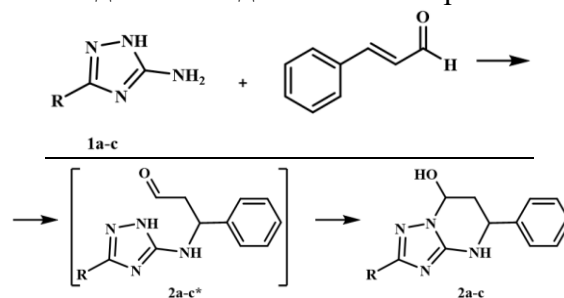


R', R'', R''' : остатки жирных кислот подсолнечного (а), пальмового (b), кокосового (с) масел

Общая методика синтеза 3-замещенных 5-амино-1H-1,2,4-триазолов (1a-c). К раствору ~0.1 моль масла (эквивалентное количество рассчитано по числу омыления) в 100 мл бутанола при перемешивании осторожно добавляли 1 см³ серной кислоты. После этого порционно добавляли к смеси 0.3 моль (40.8 г) аминогуанидинбикарбоната. Смесь подогрели до 90-95°C (наблюдали выделение углекислого газа) и кипятили с насадкой Дина-Старка и обратным холодильником, снабженным хлоркальциевой трубкой, в течение ~20 часов. По истечении этого времени в реакционную массу вносили 2 г едкого натра и продолжали кипячение в течение еще 5 часов для циклизации образованного интермедиата 1a-c*. Завершение протекания реакции фиксировали по количеству отделившейся воды в ловушке Дина-Старка (~3.5 см³). Смесь охлаждали, полученную смесь триазолов промывали водой и экстрагировали в системе бутанол-вода, удаляя водную фракцию 3 раза, органическую фракцию сушили над сульфатом натрия, после чего упаривали на роторном испарителе.

Общая методика синтеза производных 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-7-олов (2a-c). Смесь 0.1 моль коричневого альдегида и ~0.1 моль смеси аминотриазолов 1a-c в среде амфотерного ПАВ (40 мас.% от общей массы реагентов) выдерживали

при температуре 80-85°C в течение 15 минут. Смесь остужали и исследовали без выделения и дальнейшей обработки.



R: остатки жирных кислот подсолнечного (а), пальмового (b), кокосового (с) масел

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Колонка Zorbax Extend-C18 (Rapid Resolution HT 2.1 x 50 мм; 1.8 мкм) в комплексе Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, CA, USA). Подвижная фаза - ацетонитрил (А) - вода (В) + 0.1% муравьиной кислоты. Градиентное смешение растворителей. Начало - 50% (А) в течение 0.5 мин, затем, 50-95% (А) за 6.5 мин, и ещё 1.5-2 минуты при 95% (А). Температура термостата колонок 30°C. Объем инжектируемой пробы 1 мкл. Скорость 0.4 см³/мин. Элюат вводили непосредственно в ESI-MS, детектор Agilent 6230 TOF LC/MS (времяпролётный, ионизация - электроспрей). Запись и регистрацию сигналов проводили в положительной полярности; небулайзер (N₂) 20 psig; газ-осушитель (N₂), 6 см³/мин, 320°C; шкала определяемых масс 50-3200 m/z. Напряжение на капилляре -4000 В; фрагментор +191 В, скиммер +66 В, OctRF 750 В.

Обсуждение результатов

Смесь 1,2,4-аминотриазолов на основе растительных масел была получена реакцией соответствующего растительного масла с бикарбонатом аминогуанидина. Для этого масло подвергали гидролизу в присутствии серной кислоты. Образующиеся в результате *in situ* жирные кислоты вступают во взаимодействие с аминогуанидином. В результате на первой стадии образуются 2-алкилгидразин-1-карбоксимидамы 1a-c*, далее они циклизуются в среде щелочи до целевых

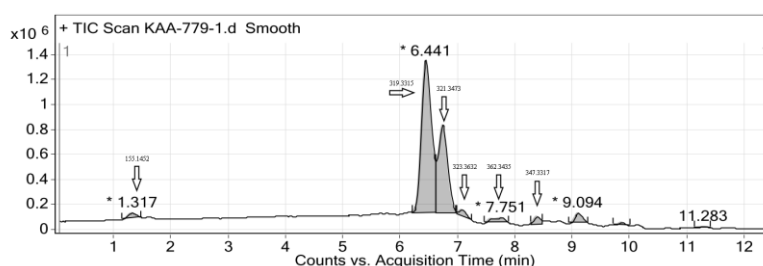


Рис. 1. Хроматограмма полного ионного тока реакционной смеси 1,2,4-аминотриазолов жирных кислот подсолнечного масла 1a

Fig. 1. Chromatogram of the total ion current of the reaction mixture of 1,2,4-aminotriazoles of sunflower oil fatty acids 1a

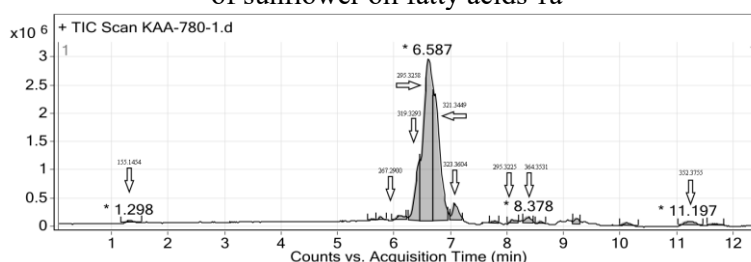


Рис. 2. Хроматограмма полного ионного тока реакционной смеси 1,2,4-аминотриазолов жирных кислот пальмового масла 1b

Fig. 2. Chromatogram of the total ion current of the reaction mixture of 1,2,4-aminotriazoles of palm oil fatty acids 1b

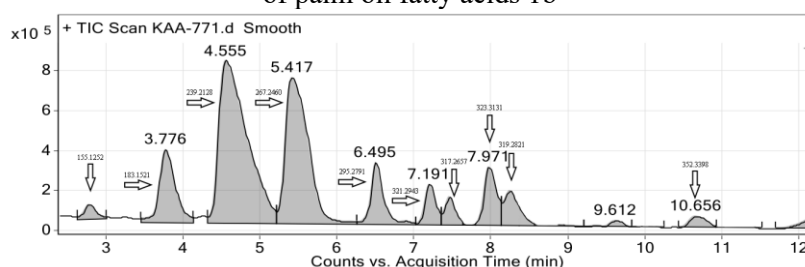


Рис. 3. Хроматограмма полного ионного тока реакционной смеси 1,2,4-амино-триазолов жирных кислот кокосового масла 1c

Fig. 3. Chromatogram of the total ion current of the reaction mixture of 1,2,4-aminotriazoles of fatty acids of coconut oil 1c

1,2,4-аминотриазолов 1a-с. Выход составил >95%.

С применением метода ВЭЖХ/МС был установлен состав полученных смесей аминотриазолов 1a-с (табл. 1, рис. 1-3). Основными признаками обнаружения исследуемых производных на хроматограмме можно считать наличие нескольких характерных или базовых пиков и, в первую очередь, наличие устойчивого молекулярного иона $[M^+]$.

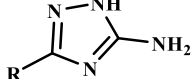
Полученные смеси 1,2,4-аминотриазолов (1a-с) были подвергнуты дальнейшему превращению с коричневым альдегидом в соответствии с ранее описанной методикой [5]. Процесс проводили путем

нагрева смеси, содержащей 0.1 моль коричневого альдегида и ~0.1 моль смеси аминотриазолов, в среде амфотерного поверхностно-активного вещества при температуре 80-85°C в течение 15 минут.

В ходе данной реакции 1,2,4-триазолы вступают в процесс превращения, который включает две последовательные стадии. Первая стадия представляет собой присоединение экзоциклической аминогруппы по кратной связи по механизму Михаэля. На второй стадии происходит внутримолекулярная циклизация, сопровождающаяся нуклеофильным присоединением к карбонильной группе. В резуль-

Таблица 1. Сводные результаты ВЭЖХ/МС анализа смесей аминотриазолов жирных кислот подсолнечного (1a), пальмового (1b) и кокосового (1c) масел

Table 1. Summary of HPLC results/MS analysis of mixtures of aminotriazoles of fatty acids of sunflower (1a), palm (1b) and coconut (1c) oils

	1a		1b		1c	
	RT, мин	м.д., %	RT, мин	м.д., %	RT, мин	м.д., %
R = C ₅ H ₁₁	1.317	1.71	1.298	0.28	2.782	2.27
R = C ₇ H ₁₅	—	—	—	—	3.859	3.84
R = C ₁₁ H ₂₃	—	—	—	—	4.572	46.30
R = C ₁₃ H ₂₇	—	—	6.090 5.758	1.55 0.62	5.551	16.40
R = C ₁₅ H ₃₁	—	—	6.587	49.92	6.496	9.01
R = C ₁₇ H ₃₃	6.723	29.91	6.720	27.52	7.192	3.50
R = C ₁₇ H ₂₉	—	—	8.079	0.97	7.457	2.50
R = C ₁₇ H ₃₅	7.071	1.81	7.051	3.70	7.988	6.35
R = C ₁₇ H ₃₁	6.441	57.88	6.438	11.22	8.452	2.83
R = C ₁₉ H ₃₅	8.381	2.27	8.378	1.54	—	—
R = C ₂₀ H ₄₁	7.751	2.50	11.197	1.19	10.640	0.21
Примеси		3.92		1.49		6.79

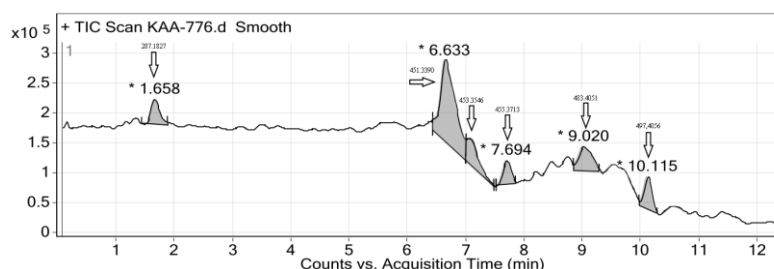


Рис. 4. Хроматограмма полного ионного тока реакционной смеси 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов жирных кислот подсолнечного масла 2a
Fig. 4. Chromatogram of the total ion current of the reaction mixture of 2-alkyl-5-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-7-ols of sunflower oil fatty acids 2a

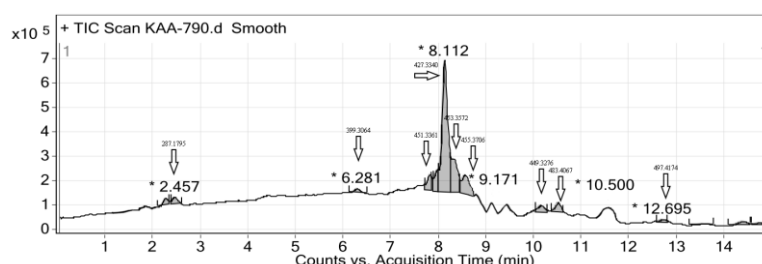


Рис. 5. Хроматограмма полного ионного тока реакционной смеси 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов жирных кислот пальмового масла 2b
Fig. 5. Chromatogram of the total ion current of the reaction mixture of 2-alkyl-5-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-7-ols of palm oil fatty acids 2b

тате данного процесса образуются производные 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов (2a-с).

Основным ожидаемым целевым продуктом данного взаимодействия являются

2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олы (2a-с), однако, не исключено образование побочных продуктов, таких как не полная циклизация триазол-5-ил)амино)-3-фе-

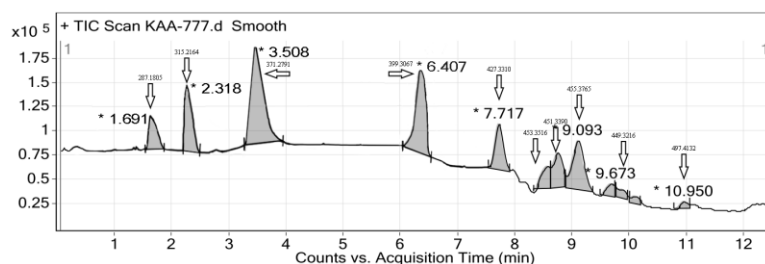
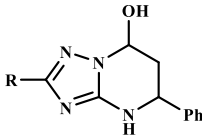


Рис.6. Хроматограмма полного ионного тока реакционной смеси 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов жирных кислот кокосового масла **2c**
Fig. 6. Chromatogram of the total ion current of the reaction mixture of 2-alkyl-5-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-7-ols of palm oil fatty acids **2c**

Таблица 2. Сводные результаты ВЭЖХ/МС анализа смесей 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов жирных кислот подсолнечного (2a), пальмового (2b) и кокосового (2c) масел

Table 2. Summary of HPLC results/MS analysis of mixtures of 2-alkyl-5-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-7-ols of fatty acids of sunflower (2a), palm (2b) and coconut (2c) oils

	2a		2b		2c	
	RT, мин	м.д., %	RT, мин	м.д., %	RT, мин	м.д., %
R = C ₅ H ₁₁	1.658	2.77	2.457 2.280	0.42 0.22	1.691	3.22
R = C ₇ H ₁₅	—	—	—	—	2.318	6.81
R = C ₁₁ H ₂₃	—	—	—	—	3.508	43.51
R = C ₁₃ H ₂₇	—	—	6.281	0.31	6.407	17.22
R = C ₁₅ H ₃₁	—	—	8.112	52.67	7.717	8.02
R = C ₁₇ H ₃₃	7.115	21.21	8.468	19.24	8.499	3.41
R = C ₁₇ H ₂₉	—	—	10.116	1.12	8.721	4.20
R = C ₁₇ H ₃₅	7.694	4.72	9.171	7.25	9.093	7.32
R = C ₁₇ H ₃₁	6.633	59.41	7.700 7.756	4.61 2.15	9.673	2.03
R = C ₁₉ H ₃₅	9.673	4.19	10.500	2.40	—	—
R = C ₂₀ H ₄₁	10.115	4.05	12.695	1.29	10.950	1.11
Примеси		3.65		8.32		3.15

нилпропан-1-олов **2a-c*** или димеры альдегидов (при автоконденсации коричневого альдегида). Тем не менее, выбранные условия реакции минимизируют побочные процессы и способствуют преимущественному образованию конденсированных систем триазолопиримидина. Это подтверждается полученными данными ВЭЖХ/МС анализа смесей **2a-c**. Спектры обнаруженных пиков включали сигналы устойчивых молекулярными ионами [M⁺] тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов. Другим свидетельством образования целевых соединений явля-

ется наличие в масс-спектрах (полученных в режиме полного ионного тока) характерных фрагментных ионов при m/z ~149 и ~151, возникающих в результате распада триазолопиримидинового ядра и соответствующих отщеплению фрагмента 3-амино-3-фенилпропан-1-ола.

Результаты ВЭЖХ/МС (табл. 1-2) показали, что состав продуктов конденсации аминотриазолов с коричневым альдегидом определяется жирнокислотным профилем исходного масла. Для подсолнечного масла (**2a**) характерно преобладание производных линолевой кислоты (59,41%), для пальмового (**2b**) – пальмитиновой

(52,67%), а для кокосового (2с) – лауриновой (43,51%), что отражает их природный состав. Пропорции и соотношения производных прочих карбоновых кислот также соответствуют среднему составу исходных триацилглицеринов. Отклонение содержания триазолопиримидинов от исходных алкиламинотриазолов не существенно.

Однако, при этом в смесях 2а-с обнаружены примеси (3-8%), вероятно соединений с неполной циклизацией, продуктов автоконденсации альдегидов, а также побочных продуктов синтеза длинноцепочечных аминотриазолов, помимо этого на хроматограммах также присутствуют неразмеченные пики, соответствующие компонентам использованного при приготовлении смесей 2а-с ПАВ. При этом основное направление реакции соответствует ожидаемому образованию триазолопиримидинов.

В целом, проведенное исследование подтвердило возможность целенаправленного получения конденсированных гетероциклов – производных 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов – из доступного и возобновляемого сырья. Установленные закономерности формирования продуктовых смесей открывают перспективы для варьирования состава ингибиторов коррозии за счёт выбора конкретного типа растительного масла. Это позволяет оптимизировать свойства получаемых композиций – от растворимости до ингибирующей активности – и делает исследованный подход привлекательным с точки зрения как фундаментальной химии, так и практического применения в нефтехимии и смежных областях.

Список литературы/References

1. Fredd C.N., Fogler H.S., *SPE Journal*, 1998; 3: 34-41. <https://doi.org/10.2118/31074-PA>
2. Iqbal M.I., Kudapa V.K., *CRC Press*, 2025: 484.

Заключение

В работе показана возможность получения новых производных 2-алкил-5-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-7-олов из подсолнечного, пальмового и кокосового масел. Методика синтеза, включающая стадии образования аминотриазолов и их конденсации с коричневым альдегидом, продемонстрировала высокую воспроизводимость и селективность. Проведённый ВЭЖХ/МС-анализ подтвердил, что состав получаемых смесей напрямую коррелирует с жирнокислотным профилем исходного сырья, что позволяет прогнозировать структуру целевых продуктов подобного превращения при использовании прочих триацилглицеринов в будущем.

Наличие побочных продуктов не препятствует выделению основных компонентов, а варьирование природы исходного масла открывает возможности для направленного синтеза ингибиторов коррозии с заданными характеристиками. Ранее проведенные коррозионные испытания показали высокую эффективность данных соединений в качестве ингибиторов кислотной коррозии стали. Таким образом, полученные данные подтверждают не только фундаментальную значимость разработанного подхода, но и его практическую ценность для создания новых антикоррозионных композиций на основе возобновляемого растительного сырья.

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.

3. Avdeev Ja. G., Kuznecov Ju. I., *Uspehi himii*, 2012; 81(12): 1133-1145. <https://doi.org/10.1070/RC2012v081n12ABEH004292> (In Russ.)

4. Swathi P.N., Rasheeda K., Samshuddin S., Alva V.D., *Journal of Asian Scientific Research*, 2017; 7: 301-308.
5. Kruzhilin A. A., Shevtsov D. S., Potapov A. Yu., Shikhaliev Kh. S., Kozaderov O. A., Prabhakar Ch., Kasatkin V. E., *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 2022; 11:

774-795. <https://doi.org/10.17675/2305-6894-2022-11-2-22>

6. Kruzhilin A.A., Lyapun D.V., Shevtsov D.S., Kozaderov O.A., Potapov A.Yu., Zartsyn I.D., Prabhakar Ch., Shikhaliev Kh.S., *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 2021; 10: 1474-1492. <https://doi.org/10.17675/2305-6894-2021-10-4->

Информация об авторах / Information about the authors

А.А. Кружилин – к.х.н., заведующий лабораторией органических добавок для процессов химического и электрохимического осаждения металлов и сплавов, применяемых в электронной промышленности, Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация, <https://orcid.org/0000-0003-2262-0131>

И.А. Дмитриев – студент кафедры органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация

М.А. Потапов – к.х.н., ведущий инженер-химик кафедры биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация

Х.С. Шихалиев – д.х.н., проф., заведующий кафедрой органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация

A.A. Kruzhilin – Ph.D., head of laboratory of organic additives for the processes of chemical and electrochemical deposition of metals and alloys used in the electronics industry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-2262-0131>, e-mail: kruzhilin.alexey@gmail.com

I.A. Dmitriev – student of the Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

M.A. Potapov – Ph.D., Leading chemical engineer of the Department of Biochemistry and Cell Physiology of the Faculty of Medical Biology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-1795-7605>, e-mail: amidines@mail.ru

Kh.S. Shikhaliev – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-6576-0305>, e-mail: chocd261@chem.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 15.09.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 15.09.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544:66

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13422

Раздельное определение содержания добавленных фосфатов методом ионной хроматографии

Арусяк Зурабовна Испирян[✉], Светлана Викторовна Сысуева,
Юлия Станиславовна Мысина, Надежда Алексеевна Бачинская,
Ирина Сергеевна Нестеренко

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия, a.ispiryan@vgnki.ru[✉]

Аннотация. Разработан межгосударственный стандарт (ГОСТ 34967-2023) раздельного определения содержания добавленных фосфатов в пищевой продукции в диапазоне измерений от 0.02 до 20.00 г/кг (г/дм³) [1]. Стандарт распространяется на пищевые продукты – молоко (включая сухое и концентрированное молоко), сливки, молодые сыры, мясо всех видов животных и птицы, мясные продукты и мясные колбасные изделия, рыбу, водных беспозвоночных и продукты, вырабатываемые из них, за исключением консервов и пресервов, и устанавливает метод ионной хроматографии с кондуктометрическим детектированием определения содержания добавленных фосфатов в форме фосфат-анионов: ортофосфат - (PO_4^{3-}), пирофосфат- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), триметафосфат- ($\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$), триполифосфат- ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$). Для экстрагирования добавленных фосфатов из анализируемой пробы применяли 2% раствор трифторуксусной кислоты, очистку экстрактов осуществляли на картриджах для твердофазной экстракции, заполненных обращенно – фазовым сорбентом (C18). Фосфаты были разделены на ионообменной хроматографической колонке DionexTM IonPacTM AS16 (250 x 4 мм) с защитной колонкой IonPacTM AG16 (50 x 4 мм) в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы А использовали раствор гидроксида калия концентрацией 100 ммоль/дм³, подвижной фазы Б – деионизованную воду. Количественное определение проводили с помощью ионного хроматографа, включающего градиентный насос, устройство для автоматического ввода проб, генератор элюента с расходным картриджем, содержащим гидроксид калия, подавитель фоновой электропроводности, кондуктометрический детектор, термостат хроматографической колонки, обеспечивающий температуру нагрева до (40±1)°С. Использование подавителя фоновой электропроводности позволило повысить чувствительность детектора за счет снижения фонового шума при высоких концентрациях гидроксида калия, необходимых для разделения полифосфатов. Градуировочный график линейный для ортофосфат-аниона в диапазоне от 1 до 200 мг/дм³ и от 1 до 100 мг/дм³ для пирофосфат, триметафосфат, триполифосфат – анионов. Коэффициент корреляции для каждого аниона более 99.5%. Предел обнаружения для фосфат-анионов 0.01 г/кг, предел определения 0.02 г/кг.

Ключевые слова: пищевые добавки, добавленные фосфаты, ионная хроматография, контроль качества и безопасности.

Для цитирования: Испирян А.З., Сысуева С.В., Мысина Ю.С., Бачинская Н.А., Нестеренко И.С. Раздельное определение содержания добавленных фосфатов методом ионной хроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 723-729. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13422>

Original article

Separate determination of the content of added phosphates by ion chromatography

Arusiak Z. Ispiryan[✉], Svetlana V. Sysueva, Yulia S. Mysina,
Nadezhda A. Bachinskaya, Irina S. Nesterenko

The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow,
Russian Federation, a.ispiryan@vgnki.ru[✉]

Abstract. Annotation. An interstate standard (GOST 34967-2023) has been developed for the separate determination of the content of added phosphates in food products in the measurement range from 0.02 to 20.00 g/kg (g/dm³) [1]. The standard applies to food products – milk (including powdered and concentrated milk), cream, young cheeses, meat of all types of animals and poultry, meat products and meat sausages, fish, aquatic invertebrates and products produced from them, with the exception of canned food and preserves, and establishes a method of ion chromatography with a conductive-classical detection of determination of the content of added phosphates in the form of phosphate anions: orthophosphate – (PO₄³⁻), pyrophosphate- (P₂O₇⁴⁻), trimethaphosphate- (P₃O₉³⁻), tripolyphosphate- (P₃O₁₀⁵⁻). A 2% solution of trifluoroacetic acid was used to extract the added phosphates from the analyzed sample, and the extracts were purified on solid-phase extraction cartridges filled with reverse-phase sorbent (C18). Phosphates were separated on an ion-exchange chromatographic column Dionex™ IonPac™ AS16 (250 x 4 mm) with a protective column IonPac™ AG16 (50 x 4 mm) in the gradient elution mode. A solution of potassium hydroxide with a concentration of 100 mmol/dm³ was used as mobile phase A, and deionized water was used as mobile phase B. The quantitative determination was carried out using an ion chromatograph, which included a gradient pump, a device for automatic sample entry, an eluent generator with a disposable cartridge containing potassium hydroxide, a background conductivity suppressor, a inductometric detector, and a chromatographic column thermostat providing a heating temperature of up to (40±1)°C. The use of a background electrical conductivity suppressor made it possible to increase the sensitivity of the detector by reducing background noise at high concentrations of potassium hydroxide necessary for the separation of polyphosphates. The calibration graph is linear for the orthophosphate anion in the range from 1 to 200 mg/dm³ and from 1 to 100 mg/dm³ for pyrophosphate, trimethaphosphate, and tripolyphosphate anions. The correlation coefficient for each anion is more than 99.5%. The detection limit for phosphate anions is 0.01 g/kg, the detection limit is 0.02 g/kg.

Keywords: food additives, added phosphates, ion chromatography, quality and safety control.

For citation: Ispiryan A.Z., Sysueva S.V., Mysina Yu.S., Bachinskaya N.A., Nesterenko I.S. Separate determination of the content of added phosphates by ion chromatography. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 723-729. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13422>

Введение

Добавленные фосфаты используются в пищевой продукции для улучшения качества и сохранности продуктов, их добавляют в продукты питания в качестве регуляторов кислотности, стабилизаторов, влагоудерживающих агентов. Так, в молочной продукции фосфаты замедляют процесс окисления и увеличивают сроки годности, в мясной и рыбной продукции удерживают влагу, обеспечивают нужную консистенцию и объём. Однако, избыток фосфатов в продуктах питания может причинить вред человеческому организму. Содержание фосфатов в пищевых продуктах регламентирует ТР ТС 029/2012 [2]. Это соли ортофосфорной кислоты: фосфаты аммония (E342), калия (E340), кальция (E341, E542), магния (E343), натрия (E339), также пирофосфаты (E450), триметафосфаты (E451), триполифосфаты (E452). В Российской Федерации действуют:

ГОСТ 9794-2015 «Продукты мясные. Методы определения содержания общего

фосфора». Настоящий стандарт распространяется на все виды мяса, включая мясо птицы, мясные и мясосодержащие продукты и устанавливает гравиметрический и спектрофотометрический методы определения массовой доли общего фосфора.

ГОСТ 32009-2013 (ISO 13730:1996). Мясо и мясные продукты. Спектрофотометрический метод определения массовой доли общего фосфора.

ГОСТ Р 55503-2013. «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Определение содержания соединений фосфора». Фотометрический метод определения ортофосфатов, полифосфатов (суммарно с пирофосфатами), общего фосфора.

ГОСТ 33500-2015 «Молоко и молочные продукты. Определение содержания фосфатов». Метод определения содержания ортофосфатов с использованием системы капиллярного электрофореза.

МУК 4.1.3217-14 Методы контроля. Химические факторы. «Определение фосфатов в пищевых продуктах и продо-

вольственном сырье». Колориметрический метод определения общего фосфора.

«Методика количественного химического анализа колбасных изделий и мясных продуктов на содержание хлоридов и фосфатов методом ионной хроматографии». Научно-технологическая компания Синтеко, Дзержинск 1997 г. Метод определения содержания ортофосфатов с использованием ионной хроматографии.

Каждый из действующих ГОСТов и методик имеет свои ограничения: не позволяет проводить раздельное определение пищевых фосфатов (ортофосфатов, пирофосфатов, трифосфатов, полифосфатов), а также определять добавленные фосфаты в тех продуктах, которые содержат естественный фосфор (мясная и рыбная продукция).

Разработанный ГОСТ 34967-2023, регламентирующий метод определения содержания добавленных пищевых фосфатов (ортофосфатов, пирофосфатов, триметафосфатов, триполифосфатов) по отдельности и в комбинации согласно требованиям ТР ТС 029/2012, расширит возможности аккредитованных лабораторий по контролю качества и безопасности сырья и пищевой продукции животного происхождения.

Экспериментальная часть

Для приготовления растворов использовали кислоту трифторуксусную (Scharlau, 99.9%), калия гидроксид (ГОСТ 24363 х.ч.), натрия гидроксид (ГОСТ 4328, х.ч.). В качестве образцов сравнения использовали ортофосфат натрия $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, CAS 7722-88-5), пирофосфат натрия ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, CAS 7722-88-5), триметафосфат натрия ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, CAS 7785-84-4), триполифосфат натрия ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, CAS 7758-29-4). Для получения деионизированной воды использовали систему подготовки воды Sartorius arium mini (Sartorius, Германия). В работе использовали ионный хроматограф

Dionex ICS-5000 с кондуктометрическим детектором, включающий градиентный насос, автосамплер, генератор элюента с расходным картриджем, содержащим раствор гидроксида калия с концентрацией 22.4%, кондуктометрический детектор с сигнальным диапазоном до 15 000 мкСм (μS), подавитель фоновой электропроводности элюента, термостат хроматографической колонки, обеспечивающий температуру нагрева до $40 \pm 1^\circ\text{C}$. Для подготовки проб и стандартных растворов пользовались весами электронными лабораторными DL-1200 (A&D Company, Япония) и Discovery DV-214C (Ohaus, США), аналитической мельницей A11 basic (IKA, Германия), встряхивателем Вортекс ReaxControl (Heidolph, Германия), центрифугой Multifuge 3S-R (Thermo Fisher Scientific, США), центрифугой Allegra X-15R (Beckman COULTER, США), ультразвуковой баней S30H (Elmasonic, Германия), одноканальными дозаторами переменного объема (Biohit, Финляндия), картриджами для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 см^3 , заполненными обращенно-фазовым сорбентом C18 с частицами диаметром не более 50 мкм, фильтрами нейлоновыми шприцевыми с размером пор 0.45 мкм OlimPeak (Teknokroma, Испания). В качестве подвижной фазы А использовали раствор гидроксида калия с концентрацией 100 ммоль/дм^3 , который готовили автоматически с помощью генератора элюента и программного обеспечения. В качестве подвижной фазы Б использовали деионизированную воду. Для разделения фосфатов использовали ионообменную колонку Dionex™ IonPac™ AS16 4x250 мм с защитной колонкой IonPac™ AG16 и устанавливали следующие параметры рабочих режимов хроматографического разделения: температура термостата колонки 35°C , скорость потока подвижной фазы $1.2\text{ см}^3/\text{мин}$, объем вводимой пробы 1666 мкл. Градиентный режим подачи подвижной фазы установили следующий:

0.0 мин (30% Б), 8.0 мин (30% Б), 17 мин (60% Б), 26.5 мин (60% Б), 35 мин (30%Б).

Исходные стандартные растворы C_0 с массовыми концентрациями фосфат-анионов 1000 мг/дм^3 готовили из навесок образцов сравнения в деионизированной воде. Градуировочные растворы готовили путем последовательного разбавления исходных растворов до концентраций 200, 100, 50, 25, 10, 5, и 1 мг/дм^3 . Для замедления гидролиза полифосфатов, а также остановки роста микроорганизмов, которые могут разрушать анионы фосфатов в стандартные растворы добавляли 0.125 см^3 раствора гидроксида калия с концентрацией 8 моль/дм^3 [3].

Для каждого аналита устанавливали линейную градуировочную характеристику как зависимость массовой концентрации от площади пика. Градуировочный график линейный для ортофосфат-аниона в диапазоне от 1 до 200 мг/дм^3 ($y=0.0989x$) и от 1 до 100 мг/дм^3 для пиррофосфат ($y=0.1135x$), триметафосфат ($y=0.1231x$), триполифосфат ($y=0.1043x$) – анионов. Коэффициент корреляции для каждого аниона более 99.5%. Хроматограмма градуировочного раствора представлена на рис.1(а). Предел обнаружения для фосфат-анионов $0,01 \text{ г/кг}$, предел определения 0.02 г/кг .

Экстракцию фосфатов из пищевых продуктов проводили с помощью 2% раствора трифторуксусной кислоты. Для предотвращения загрязнения хроматографической колонки и сохранения её эффективности экстракты очищали с помощью картриджей для твердофазной экстракции, заполненных обращенно-фазовым сорбентом C18 (SorpureTM).

Обсуждение результатов

Ионная хроматография – самый распространённый метод разделения анионов. Условия, предложенные в работах [3-7] для разделения фосфат-анионов оказались для нас неприемлемы из-за низкой скорости потока подвижной фазы,

температуры термостата колонки и введенных параметров градиентного элюирования. Для разделения ортофосфат-, пиррофосфат-, триметафосфат-, триполифосфат-анионов мы применили анионно-обменную колонку DionexTM IonPacTM AS16 $4 \times 250 \text{ мм}$ с защитной колонкой IonPacTM AG16 $4 \times 50 \text{ мм}$. При оптимизации процесса разделения фосфат - анионов мы использовали различные режимы элюирования, температуру термостата колонки, концентрацию и скорость подачи подвижной фазы (100 ммоль/дм^3 КОН). В изократическом режиме элюирования, скорости подачи подвижной фазы от 0.6 до $1.2 \text{ см}^3/\text{мин}$, температуре термостата колонки 30°C и концентрации КОН от 25 до 30%, полностью отсутствовало удерживание компонентов. При изократической подаче подвижной фазы (30% КОН), температуре термостата колонки 35°C и скорости подачи элюента $1.2 \text{ см}^3/\text{мин}$ возможно определение только ортофосфат-аниона. Для разделения остальных фосфат-анионов необходима более высокая концентрация КОН. В результате экспериментов установили, что для селективного разделения всех четырех фосфат-анионов необходимы градиентное элюирование подвижной фазы, оптимальная температура термостата колонки (35°C) и скорость подачи элюента ($1.2 \text{ см}^3/\text{мин}$).

Линейность устанавливали путем последовательного разбавления исходного смешанного стандартного раствора фосфат-анионов.

При оптимизации процесса подготовки образцов для экстракции фосфатов использовали деионизованную воду, ацетонитрил, раствор гидроксида натрия (50 ммоль/дм^3), 2% трифторуксусную и 3% уксусную кислоты [3-7]. При извлечении фосфатов деионизированной водой и раствором гидроксида натрия растворы оставались мутными и требовали дальнейшей очистки от белков. При извлечении ацетонитрилом извлечение фосфатов

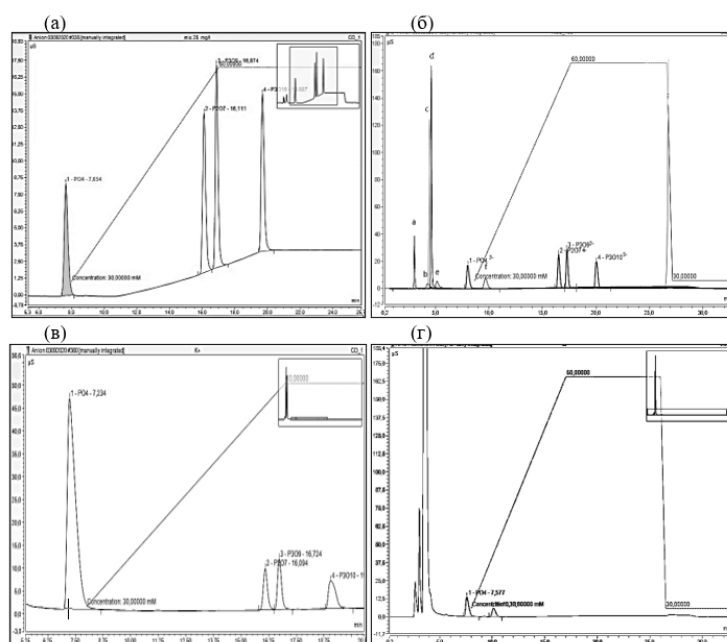


Рис. (а) Хроматограмма градуировочного раствора с концентрацией 25 мг/дм³. (б) Результат хроматографического разделения различных анионов. 1 – PO_4^{3-} , 2 – $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, 3 – $\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$, 4 – $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$; а – хлорид-ион, б – бензоат-ион, с – нитрит-ион, d – нитрат-ион, е – сорбат-ион, f – цитрат-ион. (в) Хроматограмма колбасы копченой, содержащей фосфат-анионы. (г) Хроматограмма молока, содержащего ортофосфат анион.
Fig. (a) Chromatogram of a calibration solution with a concentration of 25 mg/dm³. (b) The result of chromatographic separation of various anions. 1 – PO_4^{3-} , 2 – $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, 3 – $\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$, 4 – $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$; а – chloride ion, б – benzoate ion, с – nitrite ion, d – nitrate ion, е – sorbate ion, f – citrate ion. (c) Chromatogram of smoked sausage containing phosphate anions. (d) Chromatogram of milk containing orthophosphate anion.

Таблица. Показатели точности и прецизионности метода при определении содержания фосфат – анионов в диапазоне измерений от 0.02 до 20.00 г/кг (г/дм³)
Table. Parameters of the accuracy and precision of the method in determining the content of phosphate anions in the measurement range from 0.02 to 20.00 g/kg (g/dm³)

Аналит	Значение относительной расширенной неопределенности U_i , %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R , %	Предел повторяемости r , %
Ортофосфат-анион (PO_4^{3-})	12	2	6	6
Пирофосфат-анион ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$)	20	3	10	9
Триметафосфат-анион ($\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$)	26	3	13	9
Триполифосфат-анион ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$)	30	4	15	12

было меньше 40% из-за плохой растворимости фосфатов в ацетонитриле, а 3% уксусной кислотой – 65%. Наилучшие пока-

затели извлечения (более 80%) были получены при экстракции 2% трифторуксусной кислотой.

Переработанные продукты из мяса, молока и рыбы часто содержат хлориды, нитраты, а также бензойную, сорбиновую и лимонную кислоты. Градиентный режим подачи подвижной фазы позволил разделить эти анионы от фосфат-анионов. Результаты хроматографического разделения представлены на рис.1 (б). Хроматограмма колбасы копченой, содержащей фосфат-анионы представлена на рис.1 (в). Хроматограмма молока, содержащего ортофосфат-анион представлена на рис.1 (г).

Для установления метрологических характеристик определяли массовые доли фосфат-анионов в различных образцах с добавками. Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений содержания фосфат-анионов с относительной расширенной неопределенностью результатов измерений (при коэффициенте охвата $k=2$), указанной в таблице.

Список литературы/References

1. GOST 34967-2023 Produkt'y` pishhevy'e. Razdel'noe opredelenie so-derzhaniya dobavlenny'x fosfatov metodom ionnoj khromatografii. (In Russ.)
2. Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza TR TS 029/2012 Trebova-niya bezopasnosti pishhevy'x dobavok, aromatizatorov i texnologicheskix vspomoga-tel'ny'x sredstv. Prinyat Resheniem Soveta Evrazijskoj e'konomicheskoy komissii ot 20 iyulya 2012 goda № 58. Rezhim dostupa: <https://docs.cntd.ru/document/902359401> (In Russ.)
3. Chantarasukon C., Tukkeeree S., Rohrer J. *Application Note 1007*. <https://apps.thermo-scientific.com/media/cmd/Chromatography/Nurture/asset/2B.%20AN%201007%20Tri-Phosphates%20in%20Shrimp.pdf>

Информация об авторах / Information about the authors

А.З. Испирян – Старший научный сотрудник, «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Москва, Россия, e-mail: a.ispiryan@vgnki.ru

С.В. Сысueva – Главный специалист, «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных

Заключение

Разработанный ГОСТ 34967 распространяется на пищевые продукты и устанавливает определение содержания добавленных фосфатов в форме фосфат-анионов: ортофосфат - (PO_4^{3-}), пирофосфат- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), триметафосфат- ($\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$), триполифосфат- ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$) в диапазоне измерений от 0.02 до 20.00 г/кг (г/дм^3) методом ионной хроматографии с кондуктометрическим детектированием. Подобранные хроматографические условия, позволяющие селективно устанавливать уровень фосфат-анионов при их одновременном содержании в пищевых продуктах.

Конфликт интересов

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

4. Determination of Polyphosphates Using Ion Chromatography. *Dionex, Application Update* 172: 1-7. <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets /CMD /Application-Notes/AU-172-IC-Polyphosphates-LPN2496-EN.pdf>
5. Xie Hai-Hua, Guo Lan, Yan Aiping, Liu Fan, Wan Yiqun. *J. of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2020; 43 (17-18): 1-7. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1811726>
6. Iammarino M., Haouet N., Di Taranto A., Berardi G., Benedetti F., Di Bella S., Chiaravalle A. E.. *Food Chemistry*, 2020; 325: 126937. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126937>
7. Iammarino M., Di Taranto A. *Eur Food Res Technol.* 2012; 235: 409-417. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1766-z>

А.З. Ispiryan – Senior Researcher, All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed (FSBI VGNKI), Moscow, Russia, e-mail: a.ispiryan@vgnki.ru

S.V. Sysueva – Chief Specialist, All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed (FSBI VGNKI), Moscow, Russia, e-mail: sysueva@vgnki.ru



и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Москва, Россия, e-mail: sysueva@vgnki.ru

Ю.С. Мысина – Научный сотрудник, «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Москва, Россия, e-mail: y.mysina@vgnki.ru

Н.А. Бачинская – Главный специалист, «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), Москва, Россия, e-mail: n.bachinskaya@vgnki.ru

И.С. Нестеренко – к.х.н, заведующий отделением фармакологических лекарственных средств, безопасности пищевой продукции и кормов, Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия, e-mail: nesterenko@vgnki.ru

Yu.S. Mysina – Researcher, All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed (FSBI VGNKI), Moscow, Russia, e-mail: y.mysina@vgnki.ru

N.A. Bachinskaya – Chief Specialist, All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Livestock and Feed (FSBI VGNKI), Moscow, Russia, e-mail: n.bachinskaya@vgnki.ru

I.S. Nesterenko – PhD, Head of the Department of Pharmacological Medicines, Food and Feed Safety, All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed, Moscow, Russia, e-mail: nesterenko@vgnki.ru

Статья поступила в редакцию 28.07.2025; одобрена после рецензирования 19.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 28.07.2025; approved after reviewing 19.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13423

Новый анионообменник на основе сополимера стирола и дивинилбензола с привитым глицидилметакрилатом

Евгений Вячеславович Погоня, Анастасия Владимировна Горбовская,
Олег Алексеевич Шпигун, Анна Станиславовна Ужель[✉]

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
anna_uzhel@analyt.chem.msu.ru[✉]

Аннотация. В данной работе получен новый анионообменник на основе сополимера стирола и дивинилбензола с привитым глицидилметакрилатом в результате одностадийной обработки диметилэтанолмином. Синтезированный сорбент обладает средней степенью гидрофилизации и подходит для работы в режиме ионной хроматографии с подавлением фоновой электропроводности при использовании наиболее простого оборудования с карбонатным буферным раствором в качестве элюента. Данный анионообменник, полученный простым синтезом, может конкурировать и с коммерческими колонками за счет быстрого разделения модельных смесей анионов. Так, смесь 7 стандартных анионов можно разделить за 9 мин; смесь 7 стандартных анионов и 5 оксоанионов (селенит (или арсенат), селенат, вольфрамат, молибдат, хромат) за 19 мин; смесь 7 стандартных анионов и 3 двухосновных органических аниона (тарtrat, оксалат, малеат) за 11 мин. В результате полученный сорбент успешно применен к анализу таких объектов, как питьевые воды, газированный напиток и ополаскиватель для полости рта.
Ключевые слова: полистирол-дивинилбензол, анионообменник, ионная хроматография, карбонатный буферный раствор, анализ питьевой воды и напитков.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-13-00140

Для цитирования: Погоня Е.В., Горбовская А.В., Шпигун О.А., Ужель А.С. Новый анионообменник на основе сополимера стирола и дивинилбензола с привитым глицидилметакрилатом // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 730-738. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13423>

Original article

Novel anion exchanger based on poly(styrene-divinylbenzene) with grafted glycidyl methacrylate

Evgenii V. Pogonia, Anastasiia V. Gorbovskaia, Oleg A. Shpigun, Anna S. Uzhel[✉]

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation, anna_uzhel@analyt.chem.msu.ru[✉]

Abstract. In this work novel anion exchanger based on a copolymer of styrene and divinylbenzene with grafted glycidyl methacrylate was obtained as a result of one-stage treatment with dimethylethanolamine. The synthesized resin has an average degree of hydrophilization and is suitable for operation in suppressed ion chromatography using the simplest equipment with a carbonate buffer solution as an eluent. Obtained by simple synthesis anion exchanger can compete with commercial columns due to the rapid separation of model anion mixtures. Thus, a mixture of 7 standard anions can be separated in 9 min; a mixture of 7 standard anions and 5 oxyanions (selenite (or arsenate), selenate, tungstate, molybdate, chromate) in 19 min; a mixture of 7 standard anions and 3 divalent organic acids (tartrate, oxalate, maleate) in 11 min. As a result, the resin has been successfully applied to the analysis of such samples as drinking water, carbonated beverage, and mouthwash.

Keywords: poly(styrene-divinylbenzene), anion exchanger, ion chromatography, carbonate buffer, drinking water and beverage analysis.

Acknowledgments: this work was supported by Russian Scientific Foundation through the grant № 20-13-00140.

For citation: Pogonia E.V., Gorbovskaia A.V., Shpigun O.A., Uzhel A.S. Novel anion exchanger based on poly(styrene-divinylbenzene) with grafted glycidyl methacrylate. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 730-738. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13423>

Введение

В настоящее время ионная хроматография играет важнейшую роль для решения аналитических задач, связанных с определением ионов в различных объектах [1]. Наиболее широко используемым режимом разделения многих неорганических и органических анионов является ионная хроматография с подавлением фоновой электропроводности и кондуктометрическим детектированием (ИХ). Для эффективного разделения в этом режиме необходимо правильно выбрать матрицу будущего сорбента. Так, в качестве матрицы при создании сорбентов для ВЭЖХ предпочтителен силикагель. Несмотря на высокую механическую прочность, эффективность, возможность контролировать размер пор и удельную площадь поверхности, а также простоту модифицирования, силикагель не находит активного применения в ИХ с подавлением [2, 3]. Это связано с тем, что он стабилен при pH 1-7 [4]: в кислой среде возможен гидролиз связей между силикагелем и привитыми функциональными группами, а в щелочной – растворяется силикагель [2]. Стабильность неподвижной фазы имеет огромное значение, использование силикагеля в ИХ без предварительного модифицирования его поверхности крайне нежелательно [5, 6].

Оксиды металлов, например оксид циркония, применяют в качестве альтернативы силикагелю в обращённо-фазовой ВЭЖХ. Диоксид циркония обладает повышенной механической и термической стабильностью, а также устойчив во всем диапазоне pH [7]. Для получения анионообменников на основе оксидов металлов, безусловно, необходимо предварительное модифицирование. Недостатком является использование в качестве

элюента ацетата натрия, который нельзя использовать в ИХ с подавлением, в результате невозможно достичь высокой чувствительности [7]. Также основной проблемой использования оксидов металлов для применения в ИХ является возможность необратимой адсорбции веществ из анализируемых растворов на сорбенте. Кроме того, функциональные центры на их неоднородной поверхности способствуют уширению пиков и снижению эффективности [8].

На данный момент для синтеза сорбентов для ИХ наиболее распространёнными являются органические полимеры. Их получают путем сополимеризации метакрилатных (метилметакрилат, глицидилметакрилат, аллилметакрилат) и/или стирольных (стирол, этилвинилбензол) мономеров с сшивающими агентами (дивинилбензол, диметакрилат этиленгликоля) [9]. Неустойчивость в сильнощелочной среде – главный недостаток полимерных метакрилатных матриц (pH 1-12) [9]. Матрицы на основе поливинилового спирта обладают устойчивостью в ещё меньшем диапазоне pH 3-12. Кроме того, их эффективность и механическая стабильность ниже, чем у полиметакрилатных матриц [9], поэтому неподвижные фазы на их основе не получили широкого распространения.

Другим примером полимерных матриц являются сополимеры стирола или этилвинилбензола с дивинилбензолом (ПС-ДВБ и ЭВБ-ДВБ). Различное содержание дивинилбензола определяет степень сшивки сополимера, а значит, его механическую и химическую стабильность, а также пористость [2]. Преимуществом таких матриц являются достаточно высокая механическая стабильность и устойчивость во всем диапазоне pH. Бо-

лее того, поверхность матрицы, как правило, содержит непрореагировавшие двойные связи, с помощью которых ее можно модифицировать и увеличить степень гидрофилизации [10]. Это важно, поскольку при слабом экранировании гидрофобной поверхности матрицы анионы могут взаимодействовать с π -электронной ароматической системой сорбента. В результате удерживание анионов на сорбентах на основе полимерных матриц определяется не только за счёт ионного обмена, но и за счёт специфических взаимодействий. К таким взаимодействиям можно отнести Ван-дер-Ваальсовы [11], π - π [4], анион- π взаимодействия [12].

В работе [13] получили сорбенты на основе сополимера глицидилметакрилата, стирола и дивинилбензола (ГМА-ПС-ДВБ). Стоит обратить внимание на анионообменник, синтезированный за одну стадию взаимодействием триметиламина (ТМА) с остаточными эпоксидными группами на полимерных частицах. На данном сорбенте разделение 7 стандартных неорганических анионов с использованием карбонатного элюента происходит довольно продолжительно – примерно за 30 мин, значение $\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-)$ составляет 4.3, что свидетельствует о недостаточной гидрофильности сорбента. Это может быть связано, во-первых, с введением гидрофобного третичного амина. Использование N,N-диметилаэаноламина (ДМЭА) или N-метилдиэаноламина (МДЭА) наиболее предпочтительно для получения селективных и гидрофильных сорбентов. Во-вторых, у данной матрицы есть существенный недостаток: при сополимеризации реагентов образующиеся эпоксидные группы будут находиться как внутри слоя полимерной частицы, так и на её поверхности. В результате образования ионообменных центров в плотном слое гидрофобной матрицы происходит увеличение времени удерживания анионов и ухудшение хроматографических характеристик [14].

Большинство коммерчески доступных химически модифицированных анионообменников получают на основе ПС-ДВБ. Такие сорбенты предназначены для разделения 7 стандартных неорганических анионов при использовании карбонатных и гидрокарбонатных растворов в качестве элюента. Одной из наиболее популярных колонок такого типа является STAR-ION A300 (Phenomenex, США), позволяющая разделять 7 стандартных неорганических анионов за 8 мин при использовании карбонатного буферного раствора в качестве элюента со скоростью 2 см³/мин [4].

Использование в качестве элюента карбонатного буферного раствора в режиме ИХ всё ещё актуально по ряду причин. В первую очередь это связано с меньшей стоимостью оборудования по сравнению с хроматографами, оснащенными системами электрогенерации. Во-вторых, с большей стабильностью сорбентов в карбонатном буферном растворе по сравнению с сильнощелочными элюентами. Например, некоторые сорбенты на основе полиметакрилатов или поливинилового спирта нестабильны в сильнощелочной среде, поэтому с ними зачастую используют карбонатный элюент. Кроме того, использование карбонатного буферного раствора позволяет регулировать селективность разделения за счёт изменения соотношения $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ [4, 14, 15].

Таким образом, целью работы являются получение нового анионообменника на основе ПС-ДВБ с ковалентно привитым глицидилметакрилатом (ПС-ДВБ-ГМА) за счёт аминирования эпокси-групп ДМЭА, изучение его основных хроматографических свойств и применение для анализа объектов.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы. В качестве матрицы для синтеза сорбентов использовали ПС-ДВБ-ГМА со степенью сшивки 80%, средним диаметром частиц 5.0 ±

0.5 мкм, площадью поверхности 650 м²/г, средним объемом пор 1.2 см³/г и средний диаметром пор 25 нм.

Для синтеза использовали следующие реактивы и растворители: диметилэтанолламин (99.5%) («Aldrich», США), этанол (ч.д.а.) («Лабтех», Россия), нитрат натрия (>99.0%) («Merck», Германия).

Для приготовления подвижных фаз и растворов аналитов использовали деионизованную воду и реактивы квалификации х.ч. или ч.д.а. компаний «Химмед» и «Лабтех» (Россия), «Panreac» (Испания), «AppliChem» и «Merk» (Германия), «Acros Organics» (Бельгия).

Эксперименты проводили на ионном хроматографе Shine CIC-D120 (Qingdao Shenghan Chromatograph Technology Co., Китай), укомплектованном изократическим насосом, кондуктометрическим детектором, электромембранным подавителем фонового сигнала, автоматической системой ввода пробы и термостатом колонки. Объем дозирующей петли составлял 25 мкл. Для сбора и обработки хроматографических данных использовали программное обеспечение «Shine 8.5» (Qingdao Shenghan Chromatograph Technology Co., Китай).

Синтез сорбента. Для синтеза анионообменника использовали 1.5 г матрицы ПС-ДВБ-ГМА, которую суспендировали в 5 мл этанола. После этого добавляли 20 см³ деионизованной воды и 0.35 ммоль ДМЭА на 1 г матрицы. Далее реакционную смесь помещали в термостат и непрерывно перемешивали в течение 2 ч при 60°С. После содержимое колбы фильтровали на вакуумной установке, промывали и высушивали.

В работе использовали стальную колонку размером 100 × 4 мм. Для получения суспензии сорбента использовали деионизованную воду (20 см³ на 1 г сорбента), а для упаковки колонки – 15 мМ раствор Na₂CO₃. Введение суспензии в хроматографическую колонку, упаковку и уплотнение частиц сорбента осуществляли при давлении 400 бар при помощи

насоса «Knauer K-1900» («Knauer», Германия). Тестирование колонки проводили при температуре 30°С.

Пробоподготовка. Подготовка проб питьевых вод состояла в разбавлении пробы. Для анализа газированного напитка его дегазировали на ультразвуковой ванне в течение 10 мин, затем разбавляли в 10 раз. Подготовка ополаскивателя для полости рта заключалась в отборе 15 см³ образца и дальнейшей твердофазной экстракции с помощью патрона «Chromabond C₁₈ ec f», содержащий сорбент на основе силикагеля с привитыми радикалами C₁₈ («Macherey-Nagel», Германия). Патрон предварительно активировали с помощью 5 см³ ацетонитрила с последующей промывкой деионизованной водой.

Обсуждение результатов

В данной работе синтезировали сорбент на основе ПС-ДВБ-ГМА. Эпоксидные группы на поверхности раскрывали действием избытка ДМЭА. Полученный анионообменник тестировали в режиме ИХ для изучения селективности и эффективности разделения различных групп анионов. Все опыты проводили в изократическом режиме элюирования с использованием в качестве элюента карбонатного буферного раствора 5.5 мМ NaHCO₃ + 0.6 мМ Na₂CO₃ и 1.8 мМ NaHCO₃ + 0.2 мМ Na₂CO₃ для слабоудерживаемых анионов (pH 9.3).

Для оценки гидрофильности можно использовать значение коэффициента селективности поляризуемого нитрата к хлориду: по снижению $\alpha(\text{NO}_3/\text{Cl}^-)$ можно судить о повышении степени гидрофиллизации [16, 17]. По снижению $\alpha(\text{NO}_3/\text{Br}^-)$ – об уменьшении влияния неинонообменных взаимодействий. Также на увеличение гидрофильности и снижение степени сшивки функционального слоя указывает уменьшение $\alpha(\text{ClO}_3/\text{Cl}^-)$ и $\alpha(\text{ClO}_3/\text{NO}_3^-)$. Повышение степени экранирования ароматической матрицы можно оценить по снижению $\alpha(\text{BrO}_3/\text{Cl}^-)$.

Таблица 1. Коэффициенты селективности по парам, отражающим степень гидрофилизации функционального слоя в режиме ИХ, нормированные эффективности нитрата относительно хлорида полученного анионообменника и ранее описанных в литературе

Table 1. Selectivity coefficients for pairs reflecting the degree of hydrophilization of the functional layer in IC mode, normalized efficiencies of nitrate relative to chloride of the obtained anion exchanger and described previously in literature

Анионообменник	$\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-)$	$\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Br}^-)$	Ссылка
Анионообменник на основе сополимера ГМА-ДВБ, поверхностно модифицированного аллилглицидиловым эфиром и кватернизованного МДЭА	2.9	1.4	[20]
Анионообменник на основе сополимера ГМА-ПС-ДВБ, кватернизованного ТМА	4.3	1.5	[13]
Анионообменник на основе ПС-ДВБ, поверхностно модифицированного ГМА и ковалентно привитым ДМЭА	3.3	1.5	Данная работа

В статье [18] описали достаточно гидрофильный сорбент, полученный из аминированного ПС-ДВБ, на который действовали 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром, а образующиеся концевые эпокси-группы обработали ДМЭА. Так, значение $\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-)$ составило 2.6. В работе [19] получили двухслойный гиперразветвленный анионообменник на основе матрицы, полученной по клик-реакции с цистеамином из сополимера аллилметакрилата и дивинилбензола. Значение $\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-)$ составляет 5.4, что говорит о его гидрофобности. Для сорбента, полученного в данной работе: $\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-) = 3.3$; $\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Br}^-) = 1.5$; $\alpha(\text{ClO}_3^-/\text{Cl}^-) = 5.6$; $\alpha(\text{ClO}_3^-/\text{NO}_3^-) = 1.6$; $\alpha(\text{BrO}_3^-/\text{Cl}^-) = 1.9$. Можно заключить, что анионообменник обладает средней степенью гидрофилизации (табл. 1). Полученный сорбент позволяет эффективно разделить 7 стандартных неорганических анионов. Значение $N(\text{Cl}^-)$ составляет 15500 тт/м, а для остальных анионов от 6000 тт/м для нитрата и до 20000 тт/м для фторида.

На полученном сорбенте оксогалогениды элюируются позже хлорида, что ограничивает возможность определения хлорита и бромата в присутствии больших количеств хлорида. Также анионообменник обладает низкой селективностью по парам селенит/арсенат и хромат/тиосульфат. Стоит отметить, что с ростом

удерживания оксоанионов эффективность разделения уменьшается: с 19000 тт/м для селенита до 5000 тт/м для тиосульфата, форма пиков значительно ухудшается. Так, для сильнополяризуемого тиосульфата коэффициент асимметрии составил 6.0. Это указывает на недостаток полученного сорбента: разделение сильнополяризуемых анионов, в частности тиоцианата, перхлората и иодида, на нём не представляется возможным.

Для изучения селективности сорбента по отношению к слабоудерживаемым анионам одноосновных органических кислот снизили концентрацию компонентов элюента (1.8 мМ NaHCO_3 + 0.2 мМ Na_2CO_3). Стоит отметить, что $\alpha(\text{An}^-/\text{F}^-)$ достигает значения от 0.9 для галактуроната до 2.2 для глюконата. Для анионов двухосновных кислот значения $\alpha(\text{An}^{2-}/\text{SO}_4^{2-})$ от 0.8 для малата до 1.5 для адипата, при этом сульфат и малонат элюируются совместно. Разделение органических анионов происходит достаточно эффективно (8000-19000 и 14000-17000 тт/м для одно- и двухосновных кислот), но селективность полученной фазы по отношению к ним невысокая, в особенности по отношению к одноосновным кислотам.

На полученном сорбенте разделили модельные смеси, содержащие как неорганические, так и органические анионы.

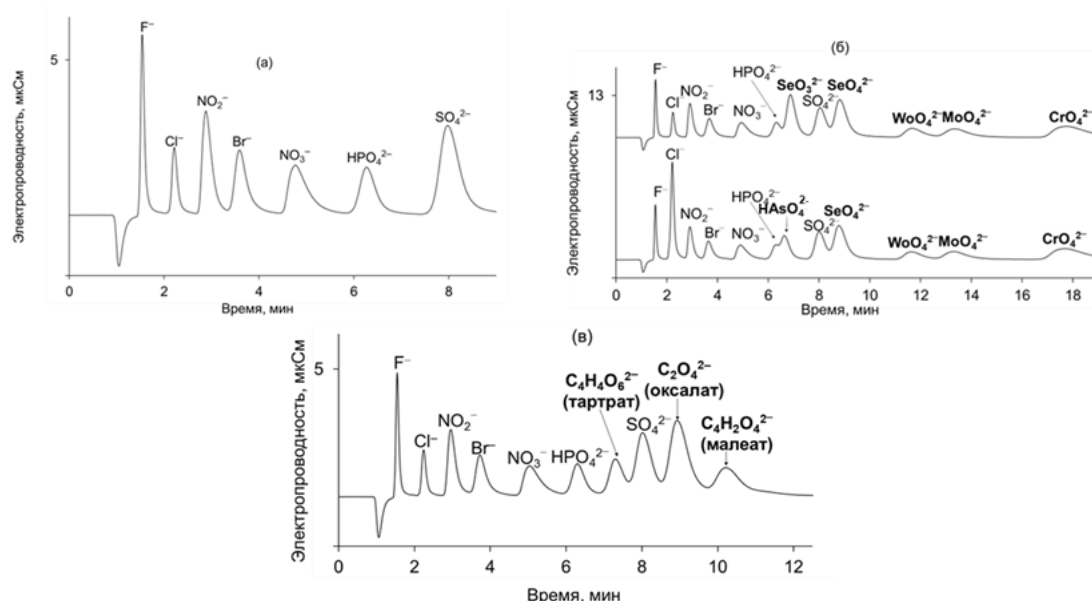


Рис. 1. Хроматограммы модельных смесей на полученном анионообменнике. (а) – 7 стандартных анионов, (б) – 7 стандартных анионов и 5 оксоанионов, (в) – 7 стандартных анионов и 3 двухосновных органических аниона. Скорость потока: 1 см³/мин.

Fig. 1. Chromatograms of model mixtures on the obtained anion exchanger. (a) – 7 standard anions, (b) – 7 standard anions and 5 oxyanions, (c) – 7 standard anions and 3 divalent organic acids. Flow rate: 1 ml/min.

Так, разделение 7 стандартных неорганических анионов происходит примерно за 9 мин, что по сравнению с [13] гораздо экспресснее. Кроме того, полученный сорбент способен разделить 7 стандартных неорганических анионов и 5 оксоанионов, включая селенит (или арсенат), селенат, вольфрамат, молибдат, хромат за 19 мин. За 11 мин осуществлено разделение смеси, содержащей 7 стандартных неорганических анионов и 3 двухосновных органических аниона – тартрата, оксалата, малеата (рис. 1).

Таким образом, полученный анионообменник на основе ПС-ДВБ-ГМА можно охарактеризовать лишь как фазу средней гидрофильности. Вероятно, для увеличения эффективности и селективности разделения необходимо проводить более сложный и многостадийный синтез, а также предварительную гидролитическую обработку матрицы для раскрытия непрореагировавших эпокси-групп и повышения степени экранирования её поверхности. Кроме того, в исследованиях

использовали карбонатный элюент, поскольку матрица неустойчива в сильно-щелочной среде. Возможно, для увеличения разрешения пиков стоит использовать более стабильные матрицы, совместимые с градиентным элюированием щёлочью. Достоинства данного сорбента состоят в том, что его получение занимает немного времени и затрат. Несмотря на неэффективное разделение сильно удерживаемых анионов, на данном анионообменнике смогли разделить смеси, содержащие до 12 анионов различной природы.

Высокая эффективность и скорость разделения 7 стандартных анионов с использованием доступного карбонатного элюента позволили найти практическое применение полученного анионообменника. Безусловно, это определение анионов в пробах воды, которое занимает важное место в аналитической химии. По наличию или отсутствию, а также концентрации анионов в пробе можно судить о возможности её загрязнения токсичными веществами. Например, присутствие бромида в пробе воды указывает на то, что,

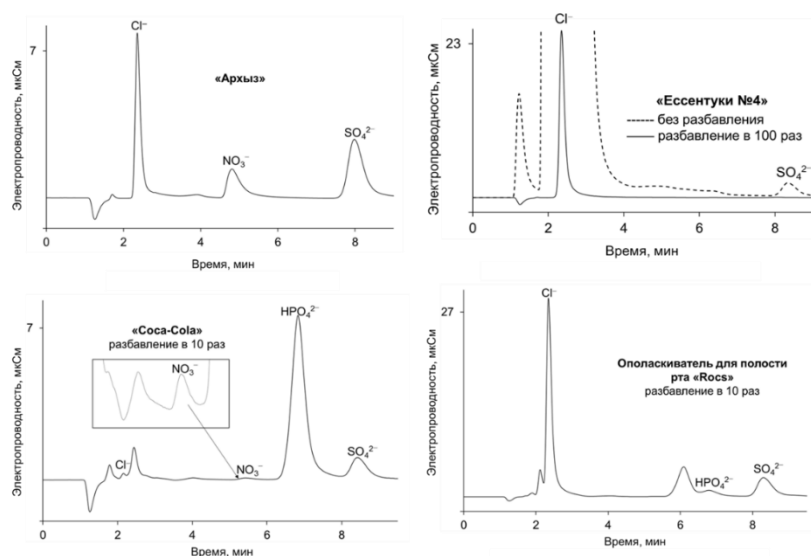


Рис. 2. Хроматограммы объектов на полученном сорбенте: питьевые воды «Архыз» и «Ессентуки №4», газированный напиток «Coca-Cola» и ополаскиватель для полости рта «Рос».

Fig. 2. Chromatograms of samples on the obtained resin: drinking waters «Arkhyz» and «Essentuki No. 4», carbonated drink «Coca-Cola» and mouthwash «Rocs».

Таблица 2. Содержание анионов и оценка правильности метода определения неорганических анионов в питьевых водах, напитке «Coca-Coal» и ополаскивателе для полости рта «Rocs» (n=3, P=0.95)

Table 2. Anion content and assessment of the accuracy of the method for determining inorganic anions in drinking water, drink «Coca-Coal» and mouthwash «Rocs» (n=3, P=0.95)

Объект	«Архыз»			«Ессентуки №4»		
Анион	В пробе без добавки, мг/л	Введено, мг/дм ³	Найдено, мг/дм ³	В пробе без добавки, мг/дм ³	Введено, мг/дм ³	Найдено, мг/дм ³
Cl ⁻	6.0±0.1	6.0	11.5±0.8	1900±300	2000	3300±400
NO ₃ ⁻	5.5±0.2	6.0	10.7±0.8	—	—	—
SO ₄ ²⁻	10.3±0.6	10.0	19.0±1.3	7.4±0.3	8.0	14.6±0.6
Объект	«Coca-Cola»			Ополаскиватель для полости рта «Rocs»		
Анион	В пробе без добавки, мг/дм ³	Введено, мг/дм ³	Найдено, мг/дм ³	В пробе без добавки, мг/дм ³	Введено, мг/дм ³	Найдено, мг/дм ³
Cl ⁻	19±1	10	25±5	230±30	200	410±30
NO ₃ ⁻	10±1	10	15±5	—	—	—
HPO ₄ ²⁻	600±100	500	1000±100	90±10	100	150±30
SO ₄ ²⁻	50±5	40	80±10	110±10	100	200±20

скорее всего, есть и бромат, если воду обрабатывают озонированием. Бромат является канцерогеном, а также превращается в токсичные вещества. Высокое содержание нитрата способствует образованию более токсичных соединений [21].

Анализ питьевых вод включает в себя определение 7 стандартных неорганических анионов, таких как фторид, хлорид, нитрит, бромид, нитрат, сульфат и фосфат. В качестве объектов анализа выбрали питьевые воды «Архыз» и «Ессентуки

№4» (рис. 2, табл. 2). В составе питьевой воды «Архыз» определили хлорид, нитрат и сульфат. В воде «Архыз» указано содержание хлоридов и сульфатов: 2-15 и 3-15 мг/дм³, соответственно. При анализе питьевой воды «Ессентуки №4» определяли хлорид и сульфат. Согласно анионному составу, указанному производителем, содержание хлорида и сульфата составляет 1300-1900 и 0.5-30 мг/дм³, соответственно. Найденные количества анионов в питьевых водах согласуются с заявленными производителями.

Кроме того, актуальной задачей современной ИХ также является одновременное определение неорганических и одно-, двух- и трёхосновных органических кислот. При производстве напитков используют такие регуляторы кислотности, как лимонная и фосфорная кислоты. В качестве объекта для определения анионов выбрали напиток «Coca-Cola», содержащий как цитрат-, так и сульфат-ионы [4]. Определение цитрат-иона не представлялось возможным на полученном анионобменнике с использованием карбонатного элюента, так как для этой задачи необходимо использование градиентного элюирования. Тем не менее, присутствие цитрата в напитке не мешает определению других анионов на разработанной колонке (рис. 2). В напитке были обнаружены хлориды, нитраты, гидрофосфаты и сульфаты (табл. 2). Также важной задачей при анализе напитков является определение оксалата, наличие которого влияет на риск образования камней в почках [4, 20]. В результате анализа оксалат-анионы не были обнаружены.

Стоит отметить, что определение содержания анионов в таких средствах личной гигиены, как ополаскиватели для полости рта, играет немаловажную роль. Авторы [22] провели исследование, заключающееся в изучении побочного влияния на организм человека компонентов, входящих в состав таких ополаскивателей. Важно, что эти объекты являются

многокомпонентными. В их состав помимо целевых веществ входят различные вспомогательные, такие как ПАВ, пенообразователи, стабилизаторы и др. Так, наличие антиоксидантов и консервантов, например, аскорбиновой и бензойной кислот, соответственно, может вызвать раздражение кожи. Безусловно, несмотря на пользу фторидов, его завышенное содержание может негативно влиять на состояние зубов. В составе также присутствуют ароматизаторы и подсластители, усложняющие пробоподготовку для определения анионов в режиме ИХ. В качестве объекта для анализа выбрали ополаскиватель для полости рта фирмы «Rocs», в котором определили хлорид, гидрофосфат и сульфат (рис. 2, табл. 2).

Пределы обнаружения 7 стандартных анионов находились в диапазоне 0.01-0.05 мг/л, а воспроизводимость в течение суток (s_r , $n=5$) составила менее 1%. Методом «введено-найденно» подтвердили правильность определения анионов (табл. 2).

Заключение

Таким образом, модифицирование диметилэтанолламином ПС-ДВБ-ГМА позволило получить анионообменник средней гидрофильности в одну стадию. Несмотря на трудности при одновременном определении сильно- и слабоудерживаемых анионов, полученный сорбент способен к разделению стандартных неорганических анионов, а также некоторых оксогоалогенидов и органических кислот. Полученный анионообменник использован для экспрессного и эффективного определения 7 стандартных неорганических анионов в питьевых водах, газированном напитке и ополаскивателе для полости рта с использованием доступного хроматографического оборудования с карбонатным элюентом.

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. Rybakova E. *J. Anal.* 2014; 4: 76-82 (In Russ.)
2. Ztirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. *Anal. Chim. Acta.* 2016; 904: 33-50.
3. Sýkora D., Řezanka P., Záruba K., Král V. *J. Sep. Sci.* 2019; 42: 89-129.
4. Weiss J. *Handbook of ion chromatography*. 4 ed. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2016. 1576 p.
5. Čoupek J., Vinš I. *J. Chromatogr. A.* 1994; 658(2): 391-398.
6. Auler L., Silva C., Collins K., Collins C. *J. Chromatogr. A.* 2005; 1073: 147-153.
7. McNeff C., Zhao Q., Carr P. *J. Chromatogr. A.* 1994; 684: 201-211.
8. Blackwell J., Carr P. *J. Chromatogr. A.* 1991; 549: 59-75.
9. Nesterenko P., Poole C., Sun Y. «Ion-Exchange Chromatography and Related Techniques». 1 ed. Amsterdam, Netherlands. Elsevier Pub. Co. 2023. 644 p.
10. Davankov V., Pavlova L., Tsyurupa M., Brady J., Balsamo M., Yousha E. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2000; 739: 73-80.
11. Bruzzoniti M.C., Mentasti E., Pohl C.A., Riviello J.M., Sarzanini C. *J. Chromatogr. A.* 2001; 925: 99-108.
12. Wheeler S.E., Houk K.N. *J. Phys. Chem. A.* 2010; 14: 8658-8664.
13. Liu J., Wang Y., Cheng H., Wang N., Wu S., Zhang P., Zhu Y. *Talanta.* 2016; 159: 272-279.
14. Dasgupta P., Maleki F. *Talanta.* 2019; 204: P. 89-137.
15. Nair L., Saari-Nordhaus R., Montgomery R. *J. Chromatogr. A.* 1997; 789: 127-134.
16. Ztirakha A.V., Pohl C.A. *J. Chromatogr. A.* 2023; 1706: 464218.
17. Gorbovskaya A.V., Popkova E.K., Uzhel A.S., Shpigun O.A., Ztirakha A.V. *J. Anal. Chem.* 2023; 78: 507-519 (In Russ.)
18. Shchukina O.I., Ztirakha A.V., Smolenkov A.D., Nesterenko P.N., Shpigun O.A. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1408: 78-86.
19. Zhang K., Lou C., Zhu Y., Zhi M., Zeng X. *Talanta.* 2018; 184: 491-498.
20. Li Z., Chen X., Zhang F., Yang B. *Chin. J. Chromatogr.* 2022; 40: 730-735.
21. Rodgers A. *Urol. Res.* 1999; 27: 77-81.
22. Yazicioglu O., Ucuncu M., *Int. Dent. J.* 2024; 74: 223-241.

Информация об авторах / Information about the authors

Е.В. Погоня – студент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, boss.pogonya@inbox.ru

А.В. Горбовская – к.х.н., н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, gorbovskaya_av@mail.ru

О.А. Шпигун – член-корр. РАН, д.х.н., г.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, shpiguno@yandex.ru

А.С. Ужель – к.х.н., с.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, anna_uzhel@analyt.chem.msu.ru

E.V. Pogonya – student, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, boss.pogonya@inbox.ru

A.V. Gorbovskaya – Researcher, Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, gorbovskaya_av@mail.ru

O.A. Shpigun – Chief Researcher, Dr. habil. (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, shpiguno@yandex.ru

A.S. Uzhel – Senior Researcher, Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, anna_uzhel@analyt.chem.msu.ru

Статья поступила в редакцию 28.09.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 28.09.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13425

Анионообменник на полимерной основе с адсорбированным слоем оксида графена: аналитическая и термодинамическая характеристика

Арсений Александрович Тимичев¹, Екатерина Сергеевна Чичканова¹,
Александр Валерьевич Каплин^{1,2}, Анастасия Владимировна Горбовская¹,
Андрей Владимирович Пирогов¹, Олег Алексеевич Шпигун¹,
Анна Станиславовна Ужель^{1✉}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
anna_uzhel@analyt.chem.msu.ru[✉]

²Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

Аннотация. Целью данной работы стало получение новой неподвижной фазы для ионной хроматографии с адсорбированным оксидом графена и изучение её свойств. Для этого сополимер стирола и дивинилбензола модифицировали путем адсорбции на его поверхности слоя оксида графена и его дальнейшего восстановления. В качестве базового слоя выступал сополимер первичного амина с диэпоксидом, полученный *in situ* и электростатически закрепленный на поверхности модифицированной матрицы. Положительно заряженные ионообменные центры были получены путем алкилирования третичных аминогрупп базового полимера диэпоксидом и дальнейшего аминирования третичным амином.

Путем построения биогарифмических зависимостей факторов удерживания ионов от концентрации элюента исследован механизм удерживания некоторых аналитов. Показано, что использованный в работе подход к синтезу анионообменников приводит к реализации преимущественно ионообменного механизма удерживания не только поляризуемых (Br^- , NO_3^- , ClO_3^-), но и сильно поляризуемых анионов (I^- , SCN^- , ClO_4^-). Для исследуемых аналитов рассчитаны кажущиеся константы ионного обмена или исправленные коэффициенты равновесия, а также показана близость рассчитанных с их помощью исправленных времен удерживания к экспериментальным данным.

Полученная неподвижная фаза показала значительное снижение селективности в парах $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ и $\text{NO}_3^-/\text{Br}^-$ и рост эффективности пиков бромид и нитрат ($N(\text{NO}_3^-) = 42000$ ТТ/м) относительно описанных в литературе химически модифицированных сорбентов со схожей структурой ионообменного слоя. Это говорит о перспективности сочетания предварительной адсорбции оксида графена и электростатического закрепления ионообменного слоя на его поверхности с целью повышения гидрофильности сорбента и степени экранирования полимерной матрицы. Продемонстрирована возможность экспрессного разделения 7 стандартных неорганических анионов (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) за 7 мин в режиме градиентного элюирования с использованием гидроксидного элюента. Полученный сорбент успешно использован для анализа питьевой воды и почвы: показана высокая внутри- и межсуточная воспроизводимость, правильность подтверждена методом «введено-найдено».

Ключевые слова: ионная хроматография, анионообменник, полистирол-дивинилбензол, оксид графена, термодинамика.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 25-13-00132.

Для цитирования: Тимичев А.А., Чичканова Е.С., Каплин А.В., Горбовская А.В., Пирогов А.В., Шпигун О.А., Ужель А.С. Анионообменник на полимерной основе с адсорбированным слоем оксида графена: аналитическая и термодинамическая характеристика // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 5. С. 739-749. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13425>

Original article

Polymer-based anion exchanger with adsorbed graphene oxide layer: analytical and thermodynamic characterization

Arsenii A. Timichev¹, Ekaterina S. Chichkanova¹, Alexander V. Kaplin^{1,2},
Anastasiia V. Gorbovskaia¹, Andrey V. Pirogov¹,
Oleg A. Shpigun¹, Anna S. Uzhel¹✉

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation, anna_uzhel@analyt.chem.msu.ru✉

²N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract. The aim of this work was to obtain a novel stationary phase for ion chromatography with an adsorbed graphene oxide and to study its properties. For this purpose, a copolymer of styrene and divinylbenzene was modified by adsorbing a layer of graphene oxide onto its surface followed by its reduction. A copolymer of a primary amine with a diepoxide obtained *in situ* and electrostatically fixed on the surface of the modified substrate served as a basement layer. The positively charged ion-exchange centers were obtained by alkylating the tertiary amino groups of the basement layer with diepoxide and further aminating with a tertiary amine.

The retention mechanism of some analytes was studied by constructing bilogarithmic dependences of ion retention factors on the eluent concentration. It was shown that the approach used in the work to the synthesis of anion exchangers leads to the implementation of a predominantly ion-exchange mechanism of retention of not only polarizable (Br^- , NO_3^- , ClO_3^-), but also strongly polarizable anions (I^- , SCN^- , ClO_4^-). For the studied analytes, the apparent ion-exchange constants or corrected equilibrium coefficients were calculated, and the closeness of the retention times calculated with their help to the experimental data was shown.

The obtained stationary phase showed a significant decrease in selectivity in $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ and $\text{NO}_3^-/\text{Br}^-$ pairs and an increase in the efficiency of the bromide and nitrate peaks ($N(\text{NO}_3^-) = 42000 \text{ TP/m}$) relative to the chemically modified resins described in the literature with a similar structure of the ion-exchange layer. This indicates the prospects of preliminary adsorption of graphene oxide followed by electrostatic attachment of an ion-exchange layer on its surface in order to increase the hydrophilicity of the stationary phase and the shielding degree of the polymer substrate. The possibility of rapid separation of 7 standard inorganic anions (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) in 7 min in the gradient elution mode using a hydroxide eluent was demonstrated. The obtained resin was successfully used for the analysis of drinking water and soil: high intra- and inter-day reproducibility was demonstrated and the accuracy was confirmed by the spike recovery experiment.

Ke words: ion chromatography, anion exchanger, polystyrene-divinylbenzene, graphene oxide, thermodynamics.

Acknowledgments: This work was supported by Russian Scientific Foundation through the grant № 25-13-00132.

For citation: Timichev A.A., Chichkanova E.S., Kaplin A.V., Gorbovskaia A.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A., Uzhel A.S. Polymer-based anion exchanger with adsorbed graphene oxide layer: analytical and thermodynamic characterization. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 739-749. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13425>

Введение

Ионная хроматография (ИХ) в настоящее время находит широкое применение в пищевой промышленности, фармацевтике, экологическом мониторинге и других областях. Создание высокоэффективных и селективных ионообменных материалов является одной из ключевых задач, стоящих перед исследователями в последние годы. Основным типом матриц ионообменников являются органические полимеры, например, сополимер стирола и дивинилбензола (ПС-ДВБ). Он

отличается высокой механической и гидростатической стабильностью во всем диапазоне pH [1]. Однако практическое применение таких материалов имеет ряд ограничений, связанных с тем, что помимо ожидаемых ионообменных процессов, на хроматографическое поведение анионов значительное влияние оказывают гидрофобные и специфические взаимодействия (π - π и анион- π взаимодействия) с ароматической матрицей носителя. Это приводит к ряду нежелательных явлений, включая нелинейность изо-

термы сорбции, аномально высокое удерживание и ухудшение формы пиков поляризуемых анионов, что в конечном итоге снижает эффективность хроматографического разделения [1-3]. Традиционными методами борьбы с неионообменными взаимодействиями является пространственное удаление ионообменных центров от поверхности матрицы [4] и её экранирование за счет разветвленного [5] и гидрофильного [6] функционального слоя.

Эффективным дополнением к ранее используемым методам экранирования и гидрофилизации полимерной матрицы является закрепление более гидрофильных частиц на её поверхности [7]. Одним из таких материалов выступает оксид графена (ОГ), в последние годы активно используемый в качестве сорбционного материала [8]. Ранее ОГ уже использовался при синтезе неподвижных фаз как для газовой, так и для жидкостной хроматографии [9]. В работе [10] показана возможность использования ОГ для получения анионообменников. Так, авторы адсорбировали частицы ОГ на поверхности ПС-ДВБ, затем восстанавливали их реакцией с гидразин гидратом для увеличения стабильности адсорбции. В качестве базового функционального слоя был выбран линейный полиэтиленимин, на основе которого был получен гиперразветвленный функциональный слой путем последовательного чередования стадий обработки метиламином (МА) и 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром (1,4-БДДГЭ). Полученные неподвижные фазы продемонстрировали невысокую эффективность ($N(\text{Cl}^-) = 15000 \text{ ТТ/м}$), однако стоит отметить высокую симметрию пиков поляризуемых бромида и нитрата, а также их высокую эффективность относительно хлорида. Данный факт, предположительно, свидетельствует о перспективности адсорбции оксида графена с дальнейшим электростатическим закреплением линейного полимера для повышения степени экранирования гидрофобной

матрицы. Поскольку использование линейного полиэтиленимина в качестве базового слоя значительно удорожает получение сорбента, в качестве альтернативы можно использовать сополимер МА и 1,4-БДДГЭ, полученный *in situ* [5].

Особую актуальность приобретают фундаментальные исследования механизмов сорбции ионов на новых типах неподвижных фаз, позволяющие совершенствовать методы модифицирования сорбционных материалов [11-13]. Теоретическое описание ионообменных процессов может базироваться на различных моделях: мембранном равновесии, осмотических явлениях или представлении о гетерогенной химической реакции обмена. Ключевым параметром, характеризующим ионообменные свойства материала, является константа ионного обмена. Однако при ее расчете возникают проблемы с определением коэффициентов активности компонентов, обменивающихся в ионите, обусловленные сложностью элементарных явлений, протекающих внутри зерна ионита на молекулярном уровне, и недостаточностью информации о них. Чаще в хроматографических работах опускают расчет коэффициентов активности анионов в неподвижной фазе и используют кажущиеся константы ионного обмена или, иначе, исправленные коэффициенты равновесия [14]. Их определение позволяет количественно оценить сродство сорбента к различным типам ионов, прогнозировать поведение аналитов в хроматографической системе, оптимизировать условия анализа, сокращая время разработки методик.

Таким образом, целью работы является получение сорбента на основе ПС-ДВБ с адсорбированным слоем ОГ, установление механизма удерживания поляризуемых анионов и расчет исправленных коэффициентов равновесия, а также изучение его хроматографических свойств и возможности применения для решения аналитических задач.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы. В качестве матрицы для синтеза сорбентов использовали ПС-ДВБ, идентичный использованному в работах [15, 16]: степень сшивки 50%, средний диаметр зерен 5.5 ± 0.5 мкм, площадь поверхности $650 \text{ м}^2/\text{г}$, средний объем пор $0.6 \text{ см}^3/\text{г}$ и средний диаметр пор 4 нм.

Для синтеза сорбента, приготовления подвижных фаз и растворов аналитов использовали деионизованную воду и реактивы квалификации х.ч. или ч.д.а. компаний «Компонент-Реактив», «Реахим», «Химмед», «Лабтех», «Сигма Тек», «Русхим» и «ALDOSА» (Россия), «Panreac» (Испания), «Merk» (Германия), «Aldrich» (США), TCI (Япония). Для синтеза ОГ был использован среднечешуйчатый графит (толщина 200 - 300 мкм) (Завальевское месторождение).

Эксперименты проводили на жидкостном хроматографе Dionex ICS-3000 (ThermoFisher Scientific, США), укомплектованном градиентным насосом, кондуктометрическим детектором, генератором элюента и электромембранным подавителем фоновых сигналов; на жидкостном хроматографе 850 Professional IC (Metrohm, Швейцария) с изократическим насосом, кондуктометрическим детектором и системой химического подавления фоновых сигналов. Сбор и обработку хроматографических данных проводили с использованием программного обеспечения «Chromeleon 6.8» (ThermoFisher Scientific, США), «MagIC Net 3.0» (Metrohm, Швейцария). Тестирование колонок проводили при скорости потока $1 \text{ см}^3/\text{мин}$, температуре 30°C . Объем петли во всех экспериментах составлял 25 мкл.

В работе использовали стальные колонки размером 50×4 мм. Для получения суспензии сорбента использовали деионизованную воду (20 см^3 на 0.5 г сорбента), а для упаковки колонок – 15 мМ раствор Na_2CO_3 . Введение суспензии в хроматографическую колонку, упаковку

и уплотнение частиц сорбента осуществляли при давлении 400 бар при помощи насоса «Knauer K-1900» («Knauer», Германия).

Синтез оксида графена. Оксид графена был получен по модифицированному методу Хаммерса, описанному в [17].

Синтез сорбента G-BTMA. Адсорбцию и восстановление оксида графена проводили аналогично [10], но в оптимизированных условиях синтеза, описанных ниже. Для получения слоя оксида графена на поверхности ПС-ДВБ 0.5 г матрицы суспендировали в 10 см^3 тетрагидрофурана. К полученной смеси добавили 10 мл водной суспензии ОГ ($0.175 \text{ мг}/\text{см}^3$), что соответствует загрузке ОГ $3.5 \text{ мг}/\text{г}$ матрицы. Суспензию перемешали в течение 1 ч, а затем упарили на роторном испарителе при 50°C . Для улучшения закрепления оксида графена на поверхности провели дополнительную стадию его восстановления. Полученные светло-серые частицы суспендировали в 20 см^3 смеси этанол:вода 1:1, затем добавили 27 мкл гидразин гидрата и 2.04 см^3 концентрированного водного раствора аммиака. Восстановление проводили при 80°C в течение 3 ч. Полученные темно-серые частицы отфильтровали и промыли последовательно дистиллированной водой и этанолом.

Для создания ионообменного слоя сначала на поверхности полученных частиц сформировали базовый слой путем реакции МА и 1,4-БДДГЭ [5,18]. Для этого 0.5 г частиц, полученных на предыдущей стадии, суспендировали в 20 см^3 смеси этанол:вода 1:1, добавили 212 мкл 95% 1,4-БДДГЭ, 109 мкл 38% раствора МА и 12.3 мг NaNO_3 . Эту и последующие реакции проводили при 60°C в течение 3 ч. Полученные частицы отфильтровали и промыли дистиллированной водой, затем вновь суспендировали в 20 см^3 воды, добавили 212 мкл 1,4-БДДГЭ и 12.3 мг NaNO_3 для кватернизации аминогрупп в базовом слое. Полученные после фильтрации и промывки дистиллированной

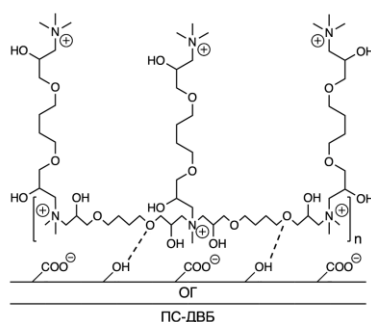


Рис. 1. Предполагаемая структура неподвижной фазы G-BTMA.

Fig. 1. Proposed structure of G-BTMA stationary phase.

водой частицы суспендировали в 20 см³ воды и провели реакцию с 176 мкл 45% раствора ТМА и 12.3 мг NaNO₃ для создания дополнительных положительно заряженных ионообменных центров. Предполагаемая структура полученной неподвижной фазы представлена на рис. 1.

Пробоподготовка почвы. Для приготовления водной вытяжки к 5 г образца почвы было добавлено 25 см³ деионизованной воды. Полученную смесь перемешивали на шейкере в течении 10 мин, а затем отфильтровали через фильтр «синяя лента». Для защиты прибора от загрязнений частичками почвы пробу водной вытяжки вводили через шприцевой фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Обсуждение результатов

В данной работе получена неподвижная фаза G-BTMA на основе полимерной матрицы с адсорбированным слоем ОГ и ионообменным функциональным слоем на его поверхности. Вместо электростатического закрепления линейного полиэтиленimina на поверхности ОГ с последующим формированием гиперразветвленного функционального слоя [10] на поверхности модифицированных частиц формировали сополимер МА и 1,4-БДДГЭ с последующей прививкой единичных ионообменных центров (рис. 1). Создание простого функционального слоя позволит проверить предположение о перспективности сочетания адсорбции оксида графена и электростатического за-

крепления линейного полимера для повышения степени экранирования ПС-ДВБ.

Известно, что повышение количества ОГ относительно ПС-ДВБ при синтезе приводит к повышению давления, создаваемого в хроматографической системе. Однако использование оптимального соотношения [10] количества ОГ (10 мг/г матрицы) привело к получению высокого давления на колонке (~28 бар/см длины колонки). Уменьшение загрузки ОГ до 3.5 мг/г позволило снизить давление до 17 бар/см длины колонки.

Для оценки воспроизводимости анионообменник G-BTMA был синтезирован трижды. Показано, что относительные стандартные отклонения факторов удерживания k' пяти стандартных неорганических анионов (F⁻, Cl⁻, NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻) составили не более 3.0%, а эффективностей – не более 6.0%. Таким образом, синтез сорбентов на основе полимерной матрицы с адсорбированным ОГ характеризуется высокой воспроизводимостью.

Термодинамическая характеристика

Как известно из литературных данных, π - π , анион- π , Ван-дер-Ваальсовы и другие неионообменные взаимодействия ведут к увеличению удерживания, а также к ухудшению симметрии и эффективности пиков поляризуемых анионов. Оценить вклад неионообменных взаимодействий в удерживание аналитов можно путем по-

Таблица 1. Коэффициенты наклона, коэффициенты корреляции линейных зависимостей $y = -A \cdot x + B$ в координатах $\lg k' - \lg C$ (k' – фактор удерживания анионов; C – концентрация элюента), и константы ионного обмена для поляризуемых и сильно поляризуемых анионов на сорбенте G-BTMA. Элюент: 2–10 мМ для Br^- , NO_3^- и ClO_3^- ; 10 – 18 мМ для I^- ; 20 – 40 мМ для SCN^- и ClO_4^-

Table 1. The slope coefficients, correlation coefficients of the linear dependencies $y = -A \cdot x + B$ in the $\lg k' - \lg C$ coordinates (k' – retention factor of analyte; C – concentration of eluting ion), and the ion-exchange constants for polarizable and highly polarizable anions on the G-BTMA resin. Eluent: 2–10 mM for Br^- , NO_3^- , and ClO_3^- ; 10 – 18 mM for I^- ; 20 – 40 mM for SCN^- and ClO_4^-

Анион	A	r	$\tilde{K}_{\text{An}^-/\text{OH}^-}$
Br^-	0.95 ± 0.01	0.999	0.89 ± 0.04
NO_3^-	0.95 ± 0.01	0.999	1.17 ± 0.06
ClO_3^-	0.94 ± 0.01	0.999	1.67 ± 0.04
I^-	0.92 ± 0.02	0.999	3.39 ± 0.07
SCN^-	0.91 ± 0.01	0.999	12.5 ± 0.4
ClO_4^-	0.93 ± 0.02	0.999	13.3 ± 0.3

строения зависимости фактора удерживания от концентрации элюента в биграфических координатах. При разделении однозарядных анионов с помощью гидроксидного элюента коэффициент наклона, равный 1.0 ± 0.1 , указывает на преимущественно ионообменный механизм удерживания [19]. Данные зависимости были получены для поляризуемых (Br^- , NO_3^- , ClO_3^-) и сильно поляризуемых (I^- , SCN^- , ClO_4^-) анионов. Показано, что несмотря на слабое экранирование поверхности ПС-ДВБ за счет неразветвленного ионообменного слоя, коэффициенты наклона зависимостей « $\lg k' - \lg C$ » для всех исследуемых аналитов близки к единице (табл. 1). При этом в работе [19] сорбент с аналогичными функциональными группами, ковалентно привитыми на поверхность ацилированной матрицы, имел коэффициент наклона 0.78 для нитрата, что свидетельствует о наличии значительного вклада неионообменных взаимодействий в его удерживание. Таким образом, использованный в работе подход к синтезу анионообменников позволяет минимизировать негативный вклад неионообменных взаимодействий в удерживание аналитов.

Для прогнозирования времен удерживания часто рассчитывают кажущиеся

константы ионного обмена или исправленные коэффициенты равновесия, которые определяют по формуле:

$$\tilde{K}_{A/B} = \frac{c_B^{1/b} a_A^{1/a}}{c_A^{1/a} a_B^{1/b}},$$

где a_i и c_i – термодинамическая активность и концентрация иона в растворе, \bar{a}_i и \bar{c}_i – те же величины в ионите [14]. Данный коэффициент связан с основными хроматографическими параметрами соотношением [20]:

$$\tilde{K}_{A/B} = \frac{\gamma_A t'_R F C}{\gamma_B V_s Q},$$

где γ_i – коэффициенты активности ионов в подвижной фазе, t'_R – исправленное время удерживания ионов, F – скорость потока элюента, C – концентрация элюента, V_s – объем неподвижной фазы, Q – удельная ёмкость колонки.

Объем неподвижной фазы вычисляли в соответствии с формулой: $V_s = V_{\text{колонки}} - V_0 + V_{\text{комм}}$, где V_0 – мёртвый объем колонки, $V_{\text{комм}}$ – объем коммуникаций от устройства ввода пробы до колонки и от колонки до детектора, $V_{\text{колонки}}$ – объем колонки. V_s в данной работе составил 0.51 см³. Удельную ёмкость колонки Q определяли динамическим методом [21], она составила 30.4 мМ.

Изучение удерживания поляризуемых анионов проводили при концентрации элюента от 2 до 10 мМ, в то время как для

Таблица 2. Экспериментальные и теоретически рассчитанные исправленные времена удерживания поляризуемых и сильно поляризуемых ионов на сорбенте G-BTMA

Table 2. The experimental and theoretically calculated corrected retention times of polarizable and highly polarizable ions on the G-BTMA resin

Анион	t' _R , мин	C _{кон} , мМ				
		2	4	6	8	10
Br ⁻	t' _{R эксп}	6.57	3.47	2.37	1.80	1.45
	t' _{R теор}	6.59	3.50	2.33	1.75	1.40
Анион	t' _{R, мин}	C _{кон} , мМ				
		20	25	30	35	40
ClO ₄ ⁻	t' _{R эксп}	10.14	8.40	6.94	5.99	5.38
	t' _{R теор}	10.12	8.36	6.96	5.97	5.42

сильно поляризуемых анионов использовали более высокие концентрации (табл. 1). В связи с этим для расчетов коэффициентов активности исследуемых анионов использовали второе приближение Дебая-Хюккеля, учитывающее собственный размер ионов:

$$\lg \gamma_i = -\frac{z_i^2 A \sqrt{I}}{1 + aB \sqrt{I}}$$

где z_i – заряд иона, I – ионная сила раствора, которая определяется соотношением: $I = \frac{1}{2} \sum (c_i z_i^2)$, $A = \frac{1,825 \cdot 10^6}{(\epsilon T)^{3/2}}$ [(л/моль)^{1/2} · К^{3/2}], ϵ – диэлектрическая постоянная раствора, T – температура, $B = \frac{5,03 \cdot 10^{11}}{\sqrt{\epsilon T}}$ [м⁻¹ · (л/моль)^{1/2} · К^{1/2}], a – эффективные ионные радиусы Киланда.

Рассчитанный исправленный коэффициент равновесия для поляризуемого Br⁻ оказался меньше единицы (табл. 1), что свидетельствует о большем сродстве гидроксид-иона к неподвижной фазе по сравнению с бромид-ионом, а следовательно, еще раз подтверждает эффективность адсорбции ОГ для эффективного экранирования ароматической матрицы.

Рассчитанные коэффициенты позволяют спрогнозировать исправленные времена удерживания конкурентных анионов и на основании этого подобрать приемлемые условия проведения анализа. В таблице 2 представлены теоретически рассчитанные и экспериментальные времена удерживания некоторых исследуемых анионов. Как видно из приведенных данных, теоретические расчеты хорошо

согласуются с экспериментальными данными. Максимальное расхождение исправленных времен удерживания составляет 3.6% для бромид-иона при концентрации элюента 10 мМ.

Аналитическая характеристика

Проведено сравнение полученного сорбента G-BTMA с ранее описанными в литературе неподвижными фазами со схожей структурой ковалентно закрепленного функционального слоя (табл. 3). Эффективность полученной неподвижной фазы по хлориду превосходит результаты для неподвижной фазы Б1 с фрагментами ТМА в функциональном слое на основе ацилированной матрицы [19], а также сравнимы для сорбентов Б2 [19] и E-BDMEA [15] с использованием более гидрофильного диметилэтанол-амина на основе ацилированной и эпокси-дированной матриц, соответственно. Однако эффективности пиков по поляризуемым бромиду и нитрату на новом анионообменнике значительно превосходят значения для ранее описанных в литературе неподвижных фаз с единичными функциональными группами. Это объясняется эффективным экранированием гидрофобной поверхности матрицы отрицательно заряженным слоем ОГ и коррелирует с выводами, сделанными при изучении механизма удерживания поляризуемых анионов. Сравнивая полученный сорбент с разветвленным анионообменником AE100-2 на основе полимерной матрицы с адсорбированным слоем ОГ из

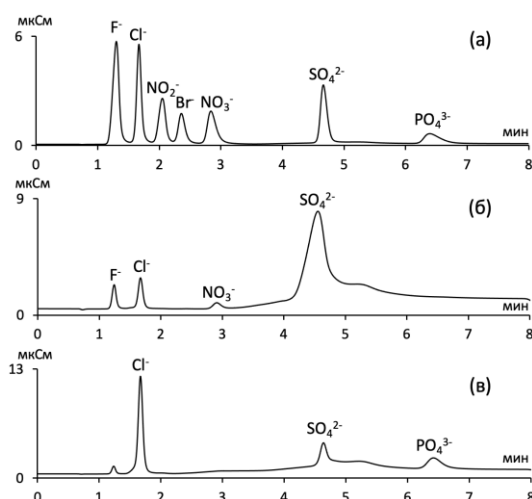


Рис. 2. Хроматограммы модельной смеси стандартных неорганических анионов (а), образцов питьевой воды (б) и водной вытяжки из почвы (в). Элюент: 0-2.5 мин – 8 мМ КОН, 2.5-4 мин – 8-20 мМ КОН. Скорость потока: 1 см³/мин.

Fig. 2. Chromatograms of model mixture of standard inorganic anions (a), drinking water (b) and soil aqueous extract samples (c). Eluent: 0-2.5 min – 8 mM KOH, 2.5-4 min – 8-20 mM KOH. Flow rate: 1 mL/min.

работы [10], можно отметить более высокую эффективность первого (табл. 3). Это связано с большей скоростью массопереноса через тонкий ионообменный слой (рис. 1) по сравнению с объемным разветвленным слоем.

О повышении гидрофильности ионообменного слоя можно судить по снижению селективности в парах $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ и $\text{NO}_3^-/\text{Br}^-$ [16], что наблюдается для полученного сорбента относительно ранее описанных в литературе ионообменников со схожей структурой ионообменного слоя [15, 19] (табл. 3). Вероятно, более высокая гидрофильность сорбента G-BTMA связана с наличием базового гидрофильного слоя, полученного путем реакции диэпоксида и первичного амина (рис. 1). Снижение данных параметров относительно разветвленного сорбента с адсорбированным слоем ОГ (табл. 3) можно объяснить различиями в структуре функционального слоя, в частности возможными сшивками соседних цепей при разветвлении [5].

На полученной неподвижной фазе G-BTMA удалось экспрессно разделить 7 стандартных неорганических анионов (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) за 7 мин в

режиме градиентного элюирования (рис. 2а), благодаря чему она была успешно применена для решения задач экологического мониторинга, таких как определение стандартных неорганических анионов в воде и почве. Хроматограммы проб питьевой воды «Черноголовка» и водной вытяжки из почвы представлены на рис. 2б и 2в, соответственно. Идентификацию стандартных неорганических анионов проводили по сравнению исправленных времен удерживаний с таковыми для стандартного раствора (рис. 2а). Количественный анализ проводили методом построения градуировочной зависимости площади пика от концентрации аналита. Диапазоны определяемых концентраций были выбраны согласно ГОСТ 31867-2012. Контроль внутри- и межсуточной воспроизводимости проводили путем повторных анализов проб. Так, стандартные отклонения времен удерживания в течение суток составили не более 1.2%, а между сутками – 1.9% ($n=5$, $P=0.95$). Диапазоны линейности, коэффициенты корреляции и пределы обнаружения определяемых анионов представлены в таблице 4.

Таблица 3. Абсолютная эффективность по хлориду, относительные эффективности ($N(\text{An}^-)/N(\text{Cl}^-)$) по поляризуемым ионам и коэффициенты селективности пар, отражающие степень гидрофилизации функционального слоя для сорбента G-BTMA, а также сорбентов Б1 и Б2 на основе ацилированной матрицы [19], E-BDMEA на основе эпоксицированной матрицы [15] и AE100-2 на основе матрицы с адсорбированным слоем ОГ [10]. Элюент: G-BTMA, E-BDMEA – 8 мМ KOH; Б1, Б2 – 5 мМ KOH; AE100-2 – 12 мМ KOH

Table 3. Absolute efficiency for chloride, relative efficiencies ($N(\text{An}^-)/N(\text{Cl}^-)$) of polarizable ions and selectivity coefficients for pairs reflecting the degree of functional layer hydrophilization on G-BTMA resin, as well as resin B1 and B2 based on acylated substrate [19], E-BDMEA based on epoxidized substrate [15] and AE100-2 based on substrate with adsorbed GO layer [10]. Eluent: G-BTMA, E-BDMEA – 8 mM KOH; B1, B2 – 5 mM KOH, AE100-2 – 12 mM KOH

Сорбент	$N(\text{Cl}^-)$, ТТ/м	$N(\text{Br}^-)/N(\text{Cl}^-)$	$N(\text{NO}_3^-)/N(\text{Cl}^-)$	$\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-)$	$\alpha(\text{NO}_3^-/\text{Br}^-)$
G-BTMA	43000	1.1	1.0	2.32	1.31
Б1 [19]	21000	0.5	0.5	3.96	1.76
Б2 [19]	40000	0.8	0.5	2.67	1.45
E-BDMEA [15]	41000	0.6	0.5	3.53	1.49
AE100-2 [10]	15200	0.9	0.8	3.95	1.44

Таблица 4. Диапазон линейности, коэффициенты корреляции и пределы обнаружения анионов для сорбента G-BTMA

Table 4. Range of calibration, correlation coefficients and limits of detection of anions for G-BTMA resin

Анион	Диапазон линейности градуировочной зависимости, мг/дм ³	r	Предел обнаружения, мкг/дм ³
F ⁻	0.3-30	0.999	0.1
Cl ⁻	0.5-50	0.999	0.1
NO ₂ ⁻	0.5-50	0.999	0.2
NO ₃ ⁻	0.5-50	0.999	0.3
SO ₄ ²⁻	0.5-50	0.999	0.1
PO ₄ ³⁻	0.5-30	0.999	2

Таблица 5. Содержание анионов и оценка правильности определения анионов в питьевой воде и водной вытяжке из почвы

Table 5. Content of anions and assessment of method accuracy for drinking water and soil aqueous extract

Питьевая вода				
Анион	Обнаружено, мг/дм ³	Введено, мг/л	Найдено, мг/дм ³	
F ⁻	0.3 ± 0.1	0.5	0.9 ± 0.2	
Cl ⁻	1.2 ± 0.1	1	2.3 ± 0.7	
NO ₃ ⁻	0.6 ± 0.1	1	1.5 ± 0.2	
SO ₄ ²⁻	13 ± 1	12	25 ± 1	
Почва				
Анион	Обнаружено, мг/дм ³	Введено, мг/дм ³	Найдено, мг/дм ³	Обнаружено в почве, мг/кг
Cl ⁻	4.2 ± 0.8	4	8.2 ± 0.9	21 ± 4
SO ₄ ²⁻	2.4 ± 0.2	2	4.4 ± 0.2	12 ± 1
PO ₄ ³⁻	3.7 ± 0.1	2	5.6 ± 0.9	19 ± 1

Результаты количественного анализа и оценка правильности определения анионов в питьевой воде и почве методом

«введено-найденно» представлены в таблице 5. Содержания всех обнаруженных неорганических анионов лежат в пределах установленных ПДК (СанПиН

1.2.3685-21). Таким образом продемонстрировано, что полученный анионообменник с адсорбированным оксидом графена подходит для экспрессного определения стандартных неорганических анионов в пробах питьевой воды и почвы при экологическом мониторинге.

Заключение

Таким образом, подход к синтезу сорбентов с использованием нанослоя адсорбированного ОГ на поверхности полимерной матрицы позволил получить высокоэффективную неподвижную фазу для ИХ. Впервые продемонстрирована возможность получения неподвижных фаз на данном типе модифицированной матрицы с электростатически закрепленным базовым слоем на основе сополимера МА и 1,4-БДДГЭ. За счет экранирования ПС-ДВБ с помощью ОГ и электростатически закрепленного ионообменного слоя получилось минимизировать вклад неионообменных взаимодействий в удерживание аналитов, в том числе поляризуемых и сильно поляризуемых анионов. Таким образом, дальнейшие исследова-

ния неподвижных фаз на основе полимерной матрицы с адсорбированным слоем ОГ для разделения сильнополяризуемых анионов являются перспективными. С помощью расчета кажущихся констант ионного обмена показана возможность прогнозирования времен удерживания исследуемых аналитов. Отмечена более высокая гидрофильность полученного сорбента относительно ранее описанных в литературе химически модифицированных неподвижных фаз со схожими функциональными группами [16, 19]. Продemonстрирована возможность использования синтезированного анионообменника для экспрессного определения стандартных неорганических анионов в объектах окружающей среды, таких как питьевая вода и почва. Показана высокая внутри- и межсуточная воспроизводимость, правильность подтверждена методом «введено-найдено».

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. Weiss J. Handbook of ion chromatography. 4 ed. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016, 1576 p. <https://doi.org/10.1002/9783527651610>
2. Pohl C.A., Stillian J.R., Jackson P.E. *J. Chromatogr. A*, 1997; 789(1-2): 29-41. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00705-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00705-X)
3. Ztirakha A.V., Uzhel A.S., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. *Mosc. Univ. Chem. Bull.*, 2017; 72(6): 289-302. <https://doi.org/10.3103/S002713141801008X>
4. Shchukina O.I., Ztirakha A. V., Smolenkov A.D., Nesterenko P.N., Shpigun O.A., *Chromatographia*, 2015; 78: 147-155. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2831-5>
5. Pohl C., Saini C., *J. Chromatogr. A*, 2008; 1213(1): 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.072>
6. Zhang K., Zhao Y., Ye M., Lou C., Zhu Y. *J. Chromatogr. A*, 2022; 1682: 463498. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463498>
7. Yu X., Lei X., Zhu Y., Zhao Q. *Microchim. Acta*, 2022; 189: 239. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05324-3>
8. Kaplin A.V., Rebrikova A.T., Eremina E.A., Chumakova N.A., Avramenko N.V., Korobov M.V. *Membranes*, 2023; 13: 53. <https://doi.org/10.3390/membranes13010053>
9. Liang X., Hou X., Chan J.H.M., Guo Y., Hilder E.F., *Trends Anal. Chem.*, 2018; 98: 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.008>
10. Zhang K., Cao M., Lou C., Wu S., Zhang P., Zhi M., Zhu Y. *Anal. Chim. Acta*, 2017; 970: 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.015>
11. McCalley D.V. *J. Chromatogr. A*, 2010; 1217(20): 3408-3417. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.011>
12. Schuster G., Lindner W., *J. Chromatogr. A*, 2013; 1301: 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.065>
13. Khrisanfova A., Smagina M., Maksimov G., Tsizin G., Shpigun O., Chernobrovkina A. J.



Chromatogr. A, 2025; 1758: 466201.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466201>

14. Ivanov V.A., Karpyuk E.A., *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protsessy*, 2015; 15(1): 19-34. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2015.15/251>

15. Gorbovskaia A.V., Talipova I.I., Timichev A.A., Uzhel A.S., Shpigun O.A., *Ind. Lab. Diagn. Mater.*, 2023; 89(10): 19-24. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2023-89-10-19-24>

16. Gorbovskaya A.V., Popkova E.K., Uzhel' A.S., Shpigun O.A., Ztirakha A.V. *J. Anal. Chem.*, 2023; 78: 748-758. <http://dx.doi.org/10.1134/s1061934823060060>

17. Marciano D.C., Kosynkin D. V., Berlin J.M., Sinitskii A., Sun Z., Slesarev A., Alemany

L.B., Lu W., Tour J.M. *ACS Nano*, 2010; 4(8): 4806-4814. <https://doi.org/10.1021/nn1006368>

18. Shen Y., Zhu X., Zhang F., Yang B., *J. Chromatogr. A*, 2025; 1746: 465792. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465792>

19. Uzhel A.S., Shchukina O.I., Ztirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. *Mosc. Univ. Chem. Bull.*, 2015; 70: 19-27. <https://doi.org/10.3103/S0027131415010083>

20. Chernova M.V., Shashnina G.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A., *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2004; 45(1): 27-30.

21. Ztirakha A.V., Smolenkov A.D., D'yachkov I.A., Shpigun O.A. *Univ. Chem. Bull.*, 2011; 52(5): 375-381.

Информация об авторах / Information about the authors

А.А. Тимичев – аспирант кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, timsenin@gmail.com

Е.С. Чичканова – студент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, chichkanova.ekaterina@mail.ru

А.В. Каплин – м.н.с. Федерального исследовательского центра химической физики имени Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия; аспирант кафедры неорганической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, alex1997kaplin@gmail.com

А.В. Горбовская – к.х.н., н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, gorbovskaia_av@mail.ru

А.В. Пирогов – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, newandry@mail.ru

О.А. Шпигун – член-корр. РАН, д.х.н., г.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, shpiguno@yandex.ru

А.С. Ужель – к.х.н., с.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, anna_uzhel@analyt.chem.msu.ru

А.А. Timichev – the postgraduate student, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, timsenin@gmail.com

E.S. Chichkanova – student, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, chichkanova.ekaterina@mail.ru

A.V. Kaplin – Junior Researcher, N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; the postgraduate student, department of Inorganic chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, alex1997kaplin@gmail.com

A.V. Gorbovskaia – Researcher, Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, gorbovskaia_av@mail.ru

A.V. Pirogov – prof., Dr. habil. (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, newandry@mail.ru

O.A. Shpigun – Chief Researcher, Dr. habil. (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, shpiguno@yandex.ru

A.S. Uzhel – Senior Researcher, Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, anna_uzhel@analyt.chem.msu.ru

Статья поступила в редакцию 05.09.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 05.09.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 81.133.032

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13421

Анализ митохондриального фонда свободных жирных кислот растений *Zea mays* (L.) при действии фитогормона кинетина в разных условиях аэрации методом газожидкостной хроматографии

Антонина Николаевна Ершова^{1✉}, Ирина Александровна Стерлигова²

¹Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, Россия, profershova@mail.ru[✉]

²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. Митохондрии растений играют важную роль в ответе растений на стрессовые воздействия. Гипоксия, как стресс, вызванный низким содержанием кислорода в среде, требует от растений не только морфологических, но и метаболических перестроек. При стрессах именно мембранные липиды могут служить субстратами для образования различных сигнальных молекул, к которым относят наряду с лизофосфолипидами, фосфатидными кислотами и свободные жирные кислоты. Однако остался невыясненным вопрос, как влияют фитогормоны, в частности кинетин, на состав свободных жирных кислот митохондрий, как основной энергетической органеллы клеток растений, в условиях различной аэрации. После введения раствора кинетина, проростки кукурузы переносили в условия разных газовых сред. Свободные жирные кислоты выделяли экстракцией липидной фракции смесью гексан : изопропанол (3:2). Выделенные свободные жирные кислоты переводили в метиловые эфиры с помощью диазометана и разделяли методом газожидкостной хроматографии. Было показано, что под действием кинетина в митохондриальном фонде свободных жирных кислот проростков кукурузы возрастало содержание пальмитиновой, стеариновой и ненасыщенной линолевой кислоты, но это не изменяло степень ненасыщенности (U/S). В условиях кратковременного дефицита кислорода содержание насыщенных жирных кислот C14- и C20-ряда падало, но возрастало содержание ненасыщенных пальмитолеиновой (C16:1) и линолевой (C18:2) кислот. Это повышало степень ненасыщенности с 0.57 до 0.72 в условиях гипоксии и до 0.62 при действии CO₂-среды. Данные изменения могут являться результатом усиления распада фосфолипидных компонентов мембран митохондрий в условиях дефицита кислорода, как показали проведенные нами ранее опыты. Предварительная обработка растений кукурузы фитогормоном кинетином, который в последнее время стали использоваться для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к различным стрессам, предотвращала уменьшение содержания в митохондриальном фонде свободных жирных кислот насыщенных кислот C-16 и C18-ряда и накопление пальмитолеиновой (C16:1) и линолевой (C18:2) кислот. Это позволяло поддерживать уровень ненасыщенности свободных жирных кислот (U/S) митохондрий в условиях дефицита кислорода на уровне аэрируемых растений.

Проведенные исследования показали, что защитное действие кинетина на растения проявляется и в способности этого фитогормона снижать в митохондриальном фонде свободных жирных кислот содержание ненасыщенных пальмитолеиновой и линолевой кислот, являющихся субстратом для липоксигеназ. Это блокирует процессы свободнорадикального окисления, защищая митохондрии от окислительного разрушения их мембран и нарушения работы ЭТЦ-дыхания в условиях гипоксического стресса и CO₂-среды.

Ключевые слова: свободные жирные кислоты, митохондрии, кинетин, газожидкостная хроматография, проростки кукурузы, гипоксия, CO₂-среда

Для цитирования: Ершова А.Н., Стерлигова И.А. Анализ митохондриального фонда свободных жирных кислот растений *Zea mays* (L.) при действии фитогормона кинетина в разных условиях аэрации методом газожидкостной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 5. С. 750-758. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13421>

Original article

Gas-liquid chromatography analysis of the mitochondrial pool of free fatty acids of *Zea mays* (L.) plants under the influence of kinetin phytohormone in different aeration conditions

Antonina N. Ershova¹✉, Irina A. Sterligova²

¹Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russian Federation, profershova@mail.ru ✉

²Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Abstract. Plant mitochondria play an important role in how plants respond to stress. Hypoxia, a form of stress caused by low content of oxygen in the environment, results in both morphological and metabolic adjustments in plants. Under stress, membrane lipids serve as substrates for the formation of various signalling molecules, which include lysophospholipids, phosphatidic acids, and free fatty acids. However, it is still unclear how phytohormones, in particular kinetin, affect the composition of free fatty acids of mitochondria, the primary energy organelle of plant cells, under various aeration conditions. During the experiment, a kinetin solution was injected into maize seedlings. Then the seedlings were transferred to various gaseous media. Free fatty acids were isolated by extraction of the lipid fraction with a mixture of hexane:isopropanol (3:2). The isolated free fatty acids were converted to methyl esters with diazomethane and separated by gas-liquid chromatography. It was shown that under the influence of kinetin, the content of palmitic, stearic, and unsaturated linoleic acids increased in the mitochondrial pool of free fatty acids of maize seedlings, however this did not change the degree of unsaturation (U/S). Under short-term oxygen deficiency, the content of saturated fatty acids (C14 and C20) decreased, while the content of unsaturated palmitoleic (C16:1) and linoleic (C18:2) acids increased. As a result, the degree of unsaturation grew from 0.57 to 0.72 under the conditions of hypoxia and to 0.62 in a CO₂ medium. These changes may be due to increased breakdown of the phospholipid components of mitochondrial membranes under the conditions of oxygen deficiency, as was shown in our previous experiments. Pre-treatment of maize plants with the kinetin phytohormone, which has recently been used to increase the resistance of agricultural plants to various stresses, prevented a decrease in the content of saturated free fatty acids (C16 and C18) in the mitochondrial pool and the accumulation of palmitoleic (C16:1) and linoleic (C18:2) acids. This made it possible to maintain the level of unsaturation of free fatty acids (U/S) of mitochondria under the conditions of oxygen deficiency at the level of aerated plants.

The conducted study showed that the protective effect of kinetin also includes the ability of this phytohormone to reduce in the mitochondrial pool of free fatty acids the content of unsaturated palmitoleic and linoleic acids, which serve as a substrate for lipoxygenases. This blocks the processes of free radical oxidation, protecting mitochondria membranes from oxidative destruction and disruption of ETC respiration under hypoxic stress and in a CO₂ medium.

Keywords: free fatty acids, mitochondria, kinetin, gas-liquid chromatography, maize seedlings, hypoxia, CO₂ medium

For citation: Ershova A.N.1 Sterligova I.A. Gas-liquid chromatography analysis of the mitochondrial pool of free fatty acids of *Zea mays* (L.) plants under the influence of kinetin phytohormone in different aeration conditions. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 750-758. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13421>

Введение

Митохондрии растений, являясь одним из центров регуляции энергетического метаболизма, играют ключевую роль в ответе растений на стрессовые воздействия как биотической, так и абиотической природы [1]. Абиотические стрессы, такие как засуха, засоление, жара, холод и наводнения, оказывают

глубокое воздействие на рост и выживание растений. Процессы адаптации и толерантность к стрессам требуют сложных механизмов восприятия, сигнализации и ответных реакций на разных уровнях организации растений на стресс [2]. Реакция растений на неблагоприятные факторы внешней среды всегда направлена на перестройку метаболических процес-

сов в клетках таким образом, чтобы повысилась степень их защиты от действия стрессового фактора. Было установлено, что способность растений адаптироваться к экстремальным условиям в значительной степени обусловлена теми сдвигами, которые происходят в мембранах клеток, включая мембраны митохондрий [1,3]. У растений гипоксия, как стресс, вызванный низким содержанием кислорода в среде, который индуцируется затоплением и переувлажнением почв или непроницаемостью покровных тканей органов, требует не только морфологических, но и метаболических перестроек. [4-6]. В последние годы большое внимание уделяется липидному, как совокупности всех липидов растений, который существенно изменяется при действии неблагоприятных факторов внешней среды, дополняя данные, полученные методами транскриптомики и протеомики [7,8]. Из полярных липидов наиболее чувствительны к дефициту кислорода оказались фосфолипиды [3,6,9]. Именно полярные липиды, к которым относят фосфолипиды и гликолипиды, являются интегральными компонентами клеточных мембран, вместе с белками определяют их структуру и функции [3,6]. При неблагоприятных условиях, включая гипоксию, усиливается распад фосфолипидов под действием фосфолипаз [3,10], что приводит к накоплению свободных жирных кислот [9,11,12]. Именно свободные жирные кислоты, способны выступать в качестве вторичных менеджеров в процессах передачи сигналов для запуска механизмов защиты растений от стрессов. Образовавшиеся свободные жирные кислоты могут изменять проницаемость биологических мембран за счет воздействия на ионные каналы и протонные насосы мембран, проявляя так называемое детергеноподобное действие [1,13]. Далее они могут метаболизироваться с образованием и биологи-

чески активных соединений типа октадеканоидов, включая и жасмоновую кислоту [12,14].

Ранее нами было показано [11], что в условиях анаэробии в клетках растений в фонде свободных жирных кислот происходят значительные изменения, связанные с увеличением содержания пальмитолеиновой и линолевой кислот. Это происходило в результате усиления деструкции фосфолипидов [15]. Подобные изменения удалось наблюдать как в фонде свободных жирных кислот гомогената, так и митохондрий. Как установлено, фитогормоны играют важную роль в повышении устойчивости растений к стрессам [3,16], изменяя состав и соотношение отдельных представителей фосфолипидов. Однако, остался не изученным вопрос о влиянии фитогормонов, в частности кинетина, на состав свободных жирных кислот митохондрий, как основной энергетической органеллы клеток растений, в условиях различной аэрации.

В связи с этим с помощью метода газожидкостной хроматографии исследовали метаболизм свободных жирных кислот митохондрий растений кукурузы, которые обрабатывались фитогормоном кинетином и переносились в условиях аэрации или дефицита кислорода.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлись проростки кукурузы сорта «Пионер», которые выращивались методом гидропоники в течение 10 дней. В этиолированные проростки без корней и семядолей с транспирационным током в течение 12 ч вводили раствор кинетина (10 мг/дм^3). Затем проростки переносили на 9 часов в затемненные вакуум-эксикаторы, через которые пропускали газовые среды: воздух (контроль), азот (содержание кислорода $0.5\% \text{ v/v}$) и углекислый газ (из баллонов). Как показали проведенных нами ранее опыты [15,17], при такой экспозиции отмечались наибольшие изменения в

составе свободных жирных кислот митохондрий проростков кукурузы.

Выделение свободных жирных кислот проводили методом [6]. Для экстракции использовали смесь гексан : изопропанол (3:2) в присутствии антиоксиданта ионола (0.001%), который предотвращает процессы перекисного окисления липидов и жирных кислот. Полученный экстракт обрабатывали 1% Na_2SO_4 для отделения водорастворимых примесей. К экстракту добавляли сначала двойной объем 0.05N калийной щелочи, а затем изопропанол. Верхний слой, который содержал калийные соли жирных кислот, отмывали петролейным эфиром и подкисляли 15% раствором HCl до pH 2.0 для перевода в свободные жирные кислоты. Свободные жирные кислоты экстрагировали петролейным эфиром, полученный экстракт упаривали в токе азота [6] и далее растворяли в гексане.

Метилирование жирных кислот проводили по методу [13] с нашими модификациями [11] с использованием диазометана. Получали диазометан в замкнутой системе и током сухого воздуха направляли в пробирку, содержащую растворенные в гексане жирные кислоты. Об окончании метилирования судили по образованию стойкой желтой окраски раствора. Объем проб метиловых эфиров жирных кислот доводили до 0.5-1.0 см^3 с помощью продувки током азота из баллона.

Метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом газожидкостной хроматографии, используя хроматограф «Chrom 42» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором и колонкой 2.5м, заполненной 10% ПЭГС на хроматоне N-AW («Chemapol», Чехия). Температура камеры испарения составляла 220°C, а термостата – 190°C. Для разделения использовали изотермический режим. Объем пробы составлял 1-2 мкл. Скорость газа носителя (гелия) и водорода – 40 $\text{см}^3/\text{мин}$, воздуха – 300 $\text{см}^3/\text{мин}$ [11].

Пики метиловых эфиров жирных кислот на хроматограммах идентифицировали по времени выхода с колонки и в сравнении со стандартным набором. В качестве стандарта использовали K-101 Mixture Zot 1314 («Sigma», США), содержащим метиловые эфиры каприновой (C10:0), лауриновой (C12:0), миристиновой (C14:0), пальмитиновой (C16:0), стеариновой (C18:0) и арахидиновой (C20:0) кислот. Использовали так же смесь метиловых эфиров, включающей метиловые эфиры пальмитиновой (C16:0), стеариновой (C18:0), олеиновой (C18:1) и линолевой (C18:2) кислот («Serva», Германия). Содержание жирных кислот определяли в относительных величинах, рассчитывая по площади пиков, и выражали в % от суммы площадей всех обнаруженных кислот на хроматограмме. Одновременно рассчитывали и соотношение ненасыщенных (U) и насыщенных (S) жирных кислот(U/S).

Все определения проводили в двух биологических и двух аналитических повторностях. Каждый опыт повторяли не менее 2-3 раз. В таблицах представлены данные одного из типичных опытов в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений. Для расчетов использовали пакет программ Microsoft Excel, обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0.05$.

Обсуждение результатов

В табл.1. приведены результаты анализа свободных жирных кислот митохондриального фонда проростков кукурузы, образование которых связано с превращением фосфолипидов [13,18,19]. В составе свободных жирных кислот митохондрий присутствовали кислоты C14-, C16-, C18 -и C20- ряда, которые в сумме составляли 97.3% от всех обнаруженных жирных кислот на хроматограммах, что совпадает с результатами предыдущих наших опытов [11]. Доминирующими среди насыщенных жирных кислот были

Таблица 1 Состав свободных жирных кислот митохондрий проростков кукурузы при действии кинетина в разных условиях аэрации (% от суммы)

Table 1. Composition of free fatty acids of mitochondria of maize seedlings under the influence of kinetin under various aeration conditions (% of the total)

Вариант	Жирные кислоты					
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:2	20:0
Воздух (контроль)						
Воздух	18.65± 0.33	24.42± 0.41	18.42± 0.51	15.24± 0.72	12.06± 0.78	8.63± 0.23
+ кинетин	13.25± 0.31	28.75± 0.73	18.78± 0.63	20.15± 0.78	14.38± 0.21	6.97± 0.58
Гипоксия						
Гипоксия	13.86± 0.25	21.83± 0.40	20.16± 0.30	15.03± 0.31	17.84± 0.55	12.53± 0.34
+ кинетин	17.75± 0.21	24.73± 0.34	22.58± 1.02	13.77± 0.54	15.71± .43	9.43± 0.72
CO ₂ -среда						
CO ₂ -среда	17.65± 0.31	29.65± 1.21	11.65± 0.33	16.15 ±0.73	13.84± 0.25	2.66± 0.22
+ кинетин	16.78± 0.62	25.72 ±1.50	7.33± 0.09	13.11± 0.22	7.80± 0.55	2.03± 0.13

пальмитиновая кислота (C16:0), содержание которой составляло 24.42%, а из ненасыщенных жирных кислот пальмитолеиновая (C16:1), содержание которой доходило до 18.42% от суммы всех свободных жирных кислот митохондрий. Подобный состав свободных жирных кислот мы уже обнаруживали и ранее [17], когда в качестве объекта был выбран именно этот сорт растений кукурузы. При обработке растений фитогормоном кинетином отмечались изменения в содержании всех обнаруженных свободных жирных кислот митохондрий. Возрастало содержание жирных кислот C18-ряда, таких как пальмитиновая и стеариновая кислоты, до 28.75±0.73% и 20.15±0.78% соответственно. Уменьшалось содержание жирных кислот C14- и C20-ряда, но отмечалось увеличение содержания ненасыщенной линолевой кислоты (C18:2). При перенесении проростков в условия кратковременного дефицита кислорода происходило снижение содержания всех насыщенных жирных кислот, но повышалось содержание ненасыщенных, паль-

митолеиновой до 20.16±0.30 % и линолевой кислоты до 17.84±0.55%. В результате подобных изменений отмечалось повышение уровня ненасыщенности свободных жирных кислот с 0.57 до 0.72 при гипоксии и до 0.62 при действии высоких концентраций диоксида углерода (CO₂-среды) (табл.2).

Предварительная обработка проростков кукурузы фитогормоном кинетином сглаживала подобные изменения в соотношении насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. В условиях гипоксии у обработанных кинетином растений показатель степени ненасыщенности U/S жирных кислот в митохондриях составлял 0.56, а при действии CO₂-среды он снизился до 0.54, что приближалось к уровню аэрируемых проростков. Нужно отметить, что процессы нормализации уровня ненасыщенности жирных кислот в митохондриальном фонде проростков кукурузы были связаны с повышением содержания моноеновых жирных кислот на фоне некоторого падения содержания диеновых кислот. Полученные результаты совпадали с данными предыдущих

Таблица 2. Влияние кинетина и условий аэрации на распределение свободных жирных кислот митохондриального фонда проростков кукурузы по степени насыщенности (% от суммы)
Table 2. Effect of kinetin and aerating conditions on content and distribution of free fatty acids in mitochondrial fund of maize seedlings (% of total)

Вариант	Жирные кислоты				
	насыщенные (S)	ненасыщенные (U)	U/S	моноеновые	диеновые
Воздух (контроль)					
Воздух	53.31	30.48	0.57	18.42±0.51	12.06±0.78
+ кинетин	62.14	32.94	0.53	18.76±0.64	14.38±0.21
Гипоксия					
Гипоксия	50.72	35.85	0.72	20.16±0.30	17.84±0.55
+ кинетин	56.30	38.29	0.56	22.58±1.02	15.71±0.43
CO ₂ -среда					
CO ₂ -среда	63.36	39.59	0.62	11.65±0.32	13.84±0.25
+ кинетин	59.10	32.08	0.54	7.33±0.09	7.80±0.55

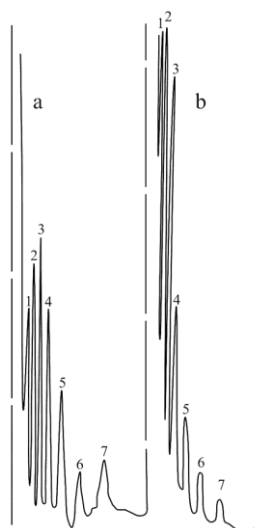


Рис. Хроматограмма свободных жирных кислот митохондрий проростков кукурузы при действии кинетина в условиях аэрации: а – контрольные растения, б– обработка кинетином; 1-метилловый эфир миристиновой (C14:0), 2-неидентифицированной, 3-пальмитиновой (C16:0), 4-пальмитолеиновой (C16:1), 5-стеариновой (C18:1), 6- линолевой (C18:2), 7-арахиновой (C20:0) кислоты

Fig. Chromatograms of free fatty acids in maize seedlings under kinetin exposed to aeration: a-control plants, b-kinetin treatment; 1-methyl ester of myristic (C14:0), 2-unidentified, 3-palmitic (C16:0), 4-palmitoleic (C16:1), 5-stearic (C18:1), 6-linoleic (C18:2), 7-arachidic (C20:0) acids

наших опытов, в которых исследовали свободные жирные кислоты гомогената проростков кукурузы [11].

Заключение

Как уже отмечалось [20,14], при различных стрессах именно мембранные липиды растений могут служить субстратами для образования сигнальных молекул, необходимых для активации адапта-

ционных процессов, к которым на данный момент и относят лизофосфолипиды, фосфатидные кислоты, оксипирины и свободные жирные кислоты. Образование свободных жирных кислот в клетках растений связывают с ферментами фосфолипазами, активность которых возрастает при действии абиотических стрессов, включая аноксию или гипоксию [9,10,12], кратковременное [1,21,22] или длительное охлаждение

[23]. Предполагается [24], что образовавшиеся свободные жирные кислоты используются на синтез нейтральных липидов и фосфолипидов, а также способны переноситься из одного вида липидов в другой [25]. В митохондриях свободные жирные кислоты могут так же расщепляться путем β -окисления до ацетил-СоА и далее включаться в реакции цикла Кребса, выступая в роли субстратов для процессов дыхания [1,13,23] или подвергаться окислительному распаду под действием соответствующих липоксигеназ [11, 19, 26]. Свободных жирных кислот в митохондриях могут выступать и в роли ингибиторов окислительного фосфорилирования [23]. В наших опытах отмечалось [18], что при действии кратковременной гипоксии в фонде свободных жирных кислот митохондрий уменьшалось содержание насыщенных жирных кислот и повышалось содержание моноеновой пальмитолеиновой (C16:1) и диеновой линолевой (C18:2) жирных кислот, что вызывало увеличение степени ненасыщенности (U/S) жирных кислот. Предполагается [15,18], что подобные изменения являются результатом усиления распада фосфолипидов, так как сопровождалось уменьшением содержания соответствующих жирных кислот в фосфолипидных компонентах растений в первые часы гипоксического стресса. Нужно отметить, что обнаруженные изменения в составе свободных жирных кислот митохондрий совпадали с таковым изменениями в фонде свободных жирных кислот, которые выделялись из гомогената растений кукурузы [17,18]. Таким образом, полученные нами результаты по изучению влияния условий кратковременной гипоксии на митохондриальный фонд свободных жирных кислот, можно объяснить и усилением процессов распада фосфолипидных компонентов мембран митохондрий. Усиление распада фосфолипидных компонентов мембран митохондрий при дефиците кислорода в окружающей среде

наблюдали ранее и для других растений [9,10,19].

Обработка растений кукурузы фитогормоном кинетином, который в последнее время стали использовать для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к различным стрессам [3,27] предотвращала изменения, связанные с действием гипоксического стресса и CO_2 -среды [3]. Как показали проведенные исследования, после обработки растений фитогормоном кинетином у проростков кукурузы в митохондриальном фонде свободных жирных кислот не отмечалось уменьшение содержания насыщенных жирных кислот C-16 и C18-ряда и повышение ненасыщенных пальмитолеиновой (C16:1) и линолевой (C18:2) жирных кислот. Это позволяло поддерживать уровень ненасыщенности свободных жирных кислот (U/S) митохондрий проростков кукурузы в условиях дефицита кислорода на уровне аэрируемых растений. Полученные результаты совпадают с исследованиями других авторов [17,28] показавших, что цитокинины препятствуют образованию у растений свободных радикалов, таких как супероксид и жирные кислоты. Если учесть, что ненасыщенные жирные кислоты являются субстратом для ферментов липоксигеназ, которые активируются в клетках растений в условиях гипоксического стресса [19], то уменьшение их количества в фонде свободных жирных кислот будет способствовать торможению и процессов свободнорадикального окисления фосфолипидов. Это будет защищать митохондрии от окислительного разрушения мембран и нарушения работы ЭТЦ-дыхания.

При действии CO_2 -среды в митохондриальном фонде свободных жирных кислот растений кукурузы происходили подобные изменения, как и при действии гипоксии, отличия касались только степени варьирования содержания отдельных жирных кислот. Под влиянием кинетина эти изменения нивелировались, что снижало степень ненасыщенности свободных

жирных кислот митохондрий до уровня азрируемых растений. Полученные нами в последние годы результаты показали, что высокие концентрации диоксида углерода активно влияли не только на метаболизм фосфолипидов [3,15], но и свободных жирных кислот гомогената [17] и митохондрий [11]. При этом влияние CO₂-среды на растения снимается действием фитогормонов, в частности кинетина, что свидетельствует об обратимости вызванных этой газовой средой изменений в липидоме растений. Именно от состава фосфолипидов зависит не только проницаемость биологических мембран, но и активность целого ряда мембраносвязанных ферментов. Это позволяет говорить о влиянии диоксида углерода, как продукта дыхательного обмена, на целый ряд метаболических процессов растений,

включая обмен органических кислот и аминокислот, синтез белка, активность ряда ферментов [3], при этом он вызывает изменения и в липидоме растений в условиях кратковременных экспозиций. Полученные результаты подтверждают высказанное ранее предположение, что диоксид углерода, как компонент газовой среды может выступать и в роли сигнальной молекулы, запускающей каскад адаптационных процессов в растительных клетках, как это показано уже для животных [18].

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. Grabelnykh O.I. *J. Stress Physiology & Biochemistry*, 2005; 1(1): 37-54.
2. Waadt R., Seller C. A., Hsu P. K., Takahashi Y., Munemasa S., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2022; 23(10): 680-694. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6>
3. Ershova A.N.I., Sterligova I.A. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2023; 23(5): 879-886. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11722>
4. Xie L.J., Zhou Y., Chen Q.F., Xiao S., *Prog Lipid Res.*, 2021; 81: 101072. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101072>
5. Van Veen H., Triozzi P.M., Loreti E., *Plant Physiol.*, 2025; 197(1): 564.
6. Wang X., *Curr Opin Plant Biol.*, 2004; 7(3): 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.012>
7. Lavilla-Puerta M., Giuntoli B., *Plant Phys.*, 2025; 197(1): 623. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae623>
8. McMillan H.M., *Plant Phys.*, 2025; 197(1): 340. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae340>
9. Rawyler A., Apragaus S., Braendle R., *Annals of Botany*, 2002; 90(4): 499-507. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf126>
10. Premkumar A, Lindberg S., Lager I., Rasmussen U., Schul A., *Physiol. Plantarum*, 2019; 167(1): 90-110. <https://doi.org/10.1111/ppl.12874>
11. Ershova A.N., Tyurina I.V., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2018; 18(6): 927-933. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/622>
12. Laxalt A.M., Munnik T., *Curr Opin Plant Biol.*, 2002; 5(4): 332-338. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00268-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00268-6)
13. Vojnikov V.K., Luzova G.B., Lemzyakova V.P., *Fiziol. i Biochim. Kult. Rastenij*, 1981; 13(2): 213-217. (In Russ.)
14. Cohen-Hoch D., Chen T., Sharabi L., De-zorella N., Itkin M., Feiguelman G., Malitsky S., Fluhr R., *Plant Physiol.*, 2025; 197(1): 589. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae589>
15. Ershova A. N., Tyurina I.V., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2022; 22(4): 502-511. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9016>
16. Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Kudryakov N.V., Kuznetsov V.V., *Fiziologiya rastenij*, 2017; 64(1): 19-32. <https://doi.org/10.7868/S001533031701016X>
17. Ershova A.N., Sterligova I.A., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2019; 19(6): 735-741. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2019.19/2241>
18. Ershova A.N., Tyurina I.V., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2020; 20(2): 207-214. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/2774>



19. Pan J., Sharif R., Xu X., Chen X., *Front Plant Sci.*, 2020; 11: 627331. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.627331>.
20. Hou Q., Ufer G., Bartels D., *Plant Cell Environ.*, 2016; 39: 1029-1048. <https://doi.org/10.1111/pce.12666>
21. Peppino Margutti M., Reyna M., Meringer M.V., Racagni G.E., Villasuso A.L., *Plant Physiol Biochem.*, 2017, 113: 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.02.008>
22. Ruelland E., Cantrel C., Gawer M., Kader J.C., Zachowski A., *Plant Physiol.*, 2002; 130: 999-1007. <https://doi.org/10.1104/pp.006080>
23. Vojnicov V.K. Temperaturnyj stress i mitohondrii restenij. Novosibirsk, Nauka Publ., 1987, 134 p. (In Russ.)
24. Fox T.C., Kennedy R.A., Rumpho M.E., *Annals of Botany*, 1994; 74(5): 445-455. <https://doi.org/10.1006/anbo.1994.1140>
25. Harwood J.L., *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 1988; 39: 101-138. <https://doi.org/10.1146/an-nurev.pp.39.060188.000533>
26. Xu L., Pan R., Zhou M., Xu Y., Zhang W., *Functional Plant Biology*, 2019; 47: 58-66. <https://doi.org/10.1071/FP19150>
27. Cortleven A., Leuendorf J.E., Frank M., Pezzetta D., Bolt S., Schmölling T., *Plant Cell Environ.*, 2019; 42(3): 998-1018. <https://doi.org/10.1111/pce.13494>
28. Leshem Y.Y., *Canad. J. Bot.*, 1984; 62(12): 2943-2949.

Информация об авторах / Information about the authors

А.Н. Ершова – профессор, д.б.н., профессор кафедры биологии растений и животных, Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, Россия

И.А. Стерлигова – студент, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

A.N. Ershova – professor, grand PhD (biology), department of plant and animal biology, Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russia, email: profershova@mail.ru

I.A. Sterligova – student, Voronezh State University, Voronezh, Russia,

Статья поступила в редакцию 06.06.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 19.11.2025.

The article was submitted 06.06.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 19.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.151:543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13444

Применение хроматографических методов для очистки аконитатгидратазы из сердца крыс с патологией и исследование некоторых каталитических свойств фермента

Евгений Дмитриевич Крыльский[✉], Татьяна Николаевна Попова,
Сергей Александрович Олейник, Данил Романович Беспалов

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, evgenij.krylsky@yandex.ru[✉]

Аннотация. В ходе настоящей работы была проведена оценка ряда каталитических и регуляторных свойств ферментного препарата цитоплазматической фракции аконитатгидратазы (АГ, КФ 4.2.1.3), очищенного с использованием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии из сердца крыс (*Rattus norvegicus* линии Wistar) с диклофенак-индуцированным повреждением миокарда, получавших дипиколиновую кислоту (ДПК). Были сформированы три экспериментальные группы животных. Крысам контрольной группы с 15 дня эксперимента вводили внутрибрюшинно физиологический раствор на протяжении 7 дней. Вторая группа животных в первый день получала 100 мкл адьюванта Фрейнда, однократно, в левую подошвенную поверхность задней лапы путем подкожной инъекции. Затем с 15 дня животным внутрибрюшинно вводили диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней. Третья группа животных параллельно с диклофенаком натрия получала внутривенно дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг массы тела. Сердце и сыворотку крови забирали через 24 часа после последней инъекции. Маркерные ферменты цитолиза кардиомиоцитов в сыворотке крови анализировали с помощью коммерческих наборов. Уровень окислительной модификации белков определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Активность АГ исследовали спектрофотометрически при 235 нм. Разделение цитоплазматической и митохондриальной фракции осуществляли с помощью дифференциального центрифугирования. С применением методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через сефадексы G-25 и G-150, и ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе проводили очистку фермента из сердца крыс. В ходе работы была получена АГ цитоплазматической фракции из сердца крыс с диклофенак-индуцированным поражением миокарда с 120-кратной степенью очистки, а из сердца крыс, получавших на фоне патологии ДПК – со степенью очистки 122.1 раза. С применением метода двойных обратных координат Лайнуивера-Берка показано, что введение крысам ДПК сопровождалось восстановлением сродства фермента к цитрату и изоцитрату, по сравнению с показателями при патологии. Помимо этого, наблюдалось изменение в направлении контроля таких параметров ферментативной реакции, как температурный и pH-оптимум, а также энергия активации. Для АГ из сердца крыс с патологией, получавших ДПК, наблюдалось более выраженное увеличение активности фермента при внесении в реакционную среду восстановленного глутатиона, по сравнению с показателями у животных, получавших только диклофенак. Выявленные сдвиги свойств АГ могли быть связаны с изменениями структурных и регуляторных особенностей молекулы фермента на фоне снижения под действием ДПК интенсивности свободнорадикального окисления, развивающегося в результате воздействия диклофенака.

Ключевые слова: аконитатгидратаза, диклофенак, дипиколиновая кислота, миокард, окислительный стресс, гель-фильтрация, ионообменная хроматография.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 25-25-00261).

Для цитирования: Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Олейник С.А., Беспалов Д.Р. Применение хроматографических методов для очистки аконитатгидратазы из сердца крыс с патологией и исследование некоторых каталитических свойств фермента // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 759-769. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13444>

Original article

The application of chromatographic techniques for the purification of aconitate hydratase isolated from the hearts of rats with pathology, and the investigation of certain catalytic properties of this enzyme

Evgenii D. Kryl'skii[✉], Tatyana N. Popova, Sergey A. Oleynik, Danil R. Beshpalov

Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, evgenij.krylsky@yandex.ru[✉]

Abstract. In this study, we evaluated the catalytic and regulatory properties of an enzyme preparation derived from the cytoplasmic fraction of rat aconitate hydratase (AH, EC 4.2.1.3), which was purified using gel filtration and ion exchange chromatography. The enzyme preparation was derived from the hearts of rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain) that had undergone myocardial injury induced by diclofenac and treated with dipicolinic acid (DPA). Three groups of animals were used in the experiment. From the 15th day of the experiment, a saline solution was administered intraperitoneally to the rats in the control group for a period of 7 days. On the first day, animals in the second group received 100 µl of Freund's adjuvant subcutaneously into the left plantar surface of their hind paw. Thereafter, from the 15th day onwards, diclofenac sodium was given intraperitoneally at a dosage of 10 mg/kg body weight for a duration of 7 days. A third group of animals concurrently received intragastric administration of DPA at 10 mg/kg, along with diclofenac sodium. Heart and blood serum samples were collected 24 hours following the final injection. Commercial kits were used to analyze marker enzymes of cardiomyocyte cytolysis in the blood serum. The level of protein oxidative modification was determined through reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The activity of AH was measured spectrophotometrically at 235 nm. Separation of the cytoplasmic and mitochondrial fractions was performed using differential centrifugation. Purification of the enzyme from rat heart tissue was achieved through techniques such as ammonium sulfate precipitation, gel filtration using G-25 and G-150 sephadex columns, and ion exchange chromatography on KM-cellulose. During the course of this work, a cytoplasmic fraction with a 120-fold purification factor was isolated from the hearts of rats with myocardial damage induced by diclofenac, and a fraction with a purification factor of 122.1 was isolated from hearts of rats with pathology treated for DPA. Using the Lineweaver-Burke double inverse coordinate method, it has been demonstrated that the administration of DPA to rats resulted in a restoration of the enzyme's affinity for citrate and isocitrate compared to pathological indicators. In addition, there were changes in the control of parameters such as temperature, pH-optimum, and activation energy of the enzymatic reaction. For AH in the heart of pathologically treated rats, there was a more significant increase in enzyme activity when reduced glutathione was added to the reaction medium, compared to animals treated with diclofenac alone. The observed alterations in the properties of AH may be linked to changes in the structural and functional characteristics of the enzyme molecule. Such alterations could be a consequence of the antioxidant activity of DPA in response to oxidative stress induced by diclofenac treatment.

Key words: aconitate hydratase, diclofenac, dipicolinic acid, myocardium, oxidative stress, gel filtration, ion exchange chromatography.

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 25-25-00261).

For citation: Kryl'skii E.D., Popova T.N., Oleynik S.A., Beshpalov D.R. The application of chromatographic techniques for the purification of aconitate hydratase isolated from the hearts of rats with pathology, and the investigation of certain catalytic properties of this enzyme. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 759-769. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13444>

Введение

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания занимают ведущее место среди причин смертности по всему миру. Одним из факторов возникновения кардиоваскулярных нарушений выступает прием нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), наиболее широко используемых лекарственных

средств, которые, однако, вызывают множество побочных эффектов [1]. Одним из наиболее часто применяемых НПВП является диклофенак, механизм действия которого связан с ингибированием фермента циклооксигеназы (ЦОГ) [2]. ЦОГ-1 и ЦОГ-2 метаболизируют арахидоновую кислоту с дальнейшим образованием простагландинов и тромбоксана, кото-

рые, помимо прочего, способствуют реализации воспалительной реакции [3]. Хотя диклофенак является неселективным ингибитором ЦОГ, он воздействует на ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в разной степени [2], что нарушает баланс простагландинов и играет ключевую роль в патогенезе ишемического повреждения миокарда посредством развития вазоконстрикции коронарных сосудов, усиления тромбообразования и ухудшения перфузии миокарда [4]. В условиях дефицита кислорода митохондрии осуществляют неполное восстановление кислорода, что сопряжено с генерацией активных форм кислорода (АФК) и развитием окислительного стресса [5].

Одним из главных защитных компонентов, нейтрализующих АФК, является глутатионовое звено антиокислительной системы, активность ферментов которой зависит от наличия восстановленного глутатиона (GSH). GSH также играет непосредственную роль в защите клеток от окислительного стресса, нейтрализуя супероксидный анион-радикал и другие АФК, превращаясь в ходе этого в окисленный глутатион (GSSG) [6]. Имеются также сведения, что истощение GSH снижает выработку АТФ митохондриями, способствует запуску митохондриально-опосредованного пути апоптоза при ишемии [7] и играет значимую роль в развитии широкого ряда других заболеваний [8].

В условиях нарушения редокс-гомеостаза актуальной задачей является исследование функционирования ферментов окислительного метаболизма, участвующих как в обменных процессах, так и отражающих состояние окислительного статуса в клетках. К данным ферментам можно отнести аконитатгидратазу (аконитаза, К.Ф. 4.2.1.3; АГ), катализирующую реакцию обратимой изомеризации цитрата в изоцитрат. Для АГ известны цитоплазматическая и митохондриальная формы, которые различаются по физико-химическим и структурным свойствам и

выполняют различные физиолого-биохимические функции, что обуславливает амфиболическую роль АГ. Кроме того, АГ, за счёт наличия железо-серного кластера в активном центре, является мишенью действия свободных радикалов [9].

Исходя из частоты использования НПВП и имеющихся у них побочных эффектов, перспективным направлением может являться разработка способов более безопасного их применения, в частности, за счёт сочетанного приёма природных безопасных соединений. Дипиколиновая кислота (пиридин-2,6-дикарбоновая кислота, ДПК) – метаболит различных видов бактерий рода *Bacillus*, который является одним из основных компонентов спор [10]. ДПК является безопасным для человека соединением и содержится в натто, традиционном японском продукте из ферментированной сои. Было изучено влияние данного соединения на свертываемость крови, в ходе чего было обнаружено, что добавление ДПК приводит к существенному ингибированию агрегации тромбоцитов [11].

Таким образом, представляет интерес исследование регуляторных и каталитических свойств АГ из сердца крыс в условиях нарушения окислительного статуса, вызванного введением диклофенака, и корректирующего действия ДПК. Исходя из этого, целью настоящей работы стала очистка АГ с использованием ионообменной и гель-хроматографии, исследование её каталитических свойств, а также анализ регуляторного воздействия GSH на данный фермент из сердца крыс с диклофенак-индуцированным поражением миокарда, получавших ДПК.

Экспериментальная часть

В ходе исследования использовали крыс-самцов линии Вистар с массой тела 200-250 г, содержащихся при 12-часовом цикле свет/темнота и неограниченном доступе к воде и пище. Исследование на животных проводилось в соответствии с требованиями Этического комитета по

экспертизе биомедицинских исследований в ФГБОУ ВО «ВГУ» (протокол № 5001-01 от 11.11.2025) и в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС. Крысы были разделены на три группы по 8 животных в каждой. Группа 1 (Кон) с 15 дня эксперимента получала внутрибрюшинно физиологический раствор на протяжении 7 дней. Вторая группа животных (Дикл) в первый день получала 100 мкл адьюванта Фрейнда, однократно, в левую подошвенную поверхность задней лапы путем подкожной инъекции. Затем с 15 дня животным внутрибрюшинно вводили диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней [12]. Третья группа животных (ДПК) параллельно с диклофенаком натрия получала внутрижелудочно дипиколоновую кислоту в дозе 10 мг/кг массы тела. Дозы тестируемого соединения были подобраны на основании дозировок аспирина, способного ингибировать агрегацию тромбоцитов, блокируя синтез тромбосана А₂ [13]. Через двадцать четыре часа после последнего введения соединений крыс наркотизировали хлороформом, забирали образцы крови из сердца шприцом, предварительно промытым изотоническим раствором, с иглой размером 21G, а также сердце для биохимического анализа.

Активность креатинкиназы МВ (КК-МВ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови определяли с помощью диагностических наборов Abris+ (Россия). Интенсивность окислительной модификации белков оценивали с помощью метода, основанного на взаимодействии карбонильных групп и аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, имеющих максимум поглощения при 370 нм [14]. Образец разбавляли 100 мМ фосфатным буфером (рН 7.4), затем добавляли 10 мм 2,4-ДНФГ, растворенного в 2.5 М НСl, смесь инкубировали в течение 1 ч, а затем добавляли

20%-ную трихлоруксусную кислоту. После охлаждения образцы центрифугировали при 3000 g, белковый осадок промывали 10%-ной трихлоруксусной кислотой и смесью этанола и этилацетата (1:1), а затем растворяли в 2 мл 8 М мочевины. Оптическую плотность экспериментального образца измеряли при длине волны 370 нм относительно контрольного образца, обработанного 2.5 М соляной кислотой. Для расчета содержания карбонильных аминокислотных групп в белках использовали молярный коэффициент экстинкции $\epsilon=22.000 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$. Активность АГ определяли спектрофотометрическим методом при 235 нм. Среда для анализа активности фермента представляла собой 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7.8, содержащий 0.15 мМ цитрат. Реакцию инициировали внесением исследуемого образца в спектрофотометрическую кювету. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при 25°C. С помощью набора BCA Protein Colorimetric Assay Kit (Elabscience, США) измеряли концентрацию белка.

Для разделения митохондриальной и цитоплазматической фракций сердце гомогенизировали в среде 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 8.3), содержащего 1 мМ ЭДТА, 2 мМ β -меркаптоэтанол и 0.3 М сахарозу, после чего фракции разделяли с помощью дифференциального центрифугирования при 15 000 g в течение 15 минут. Для получения ферментных препаратов АГ из цитоплазматической фракции использовалась следующая схема очистки. На первом этапе проводили разделение белков сульфатом аммония $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ путем ступенчатого повышения концентрации данного соединения в цитоплазматической фракции от 0 до 40%, затем от 40 до 65%. Далее очистку осуществляли с помощью гель-фильтрации через сефадекс G-25 (1.4×20 см), ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и гель-фильтрации через сефа-

декс G-150 (2.0×40 см). Образец наносили на сефадекс G-25 в количестве не более 20-25% от объема колонки, на сефадекс G-150 – в объеме не более 2%. Трис-HCl буфер (pH 7.8) 0,01 М использовали в качестве элюирующей среды. Скорость элюции составляла 30 мл/ч и 15 мл/ч на сефадексах G-25 и G-150 соответственно. Ферментативную активность оценивали в каждой фракции объемом 2 мл. Фракции, характеризующиеся максимальной активностью после хроматографии на сефадексе G-25 объединяли и использовали для дальнейшей очистки с использованием ионообменной хроматографии на колонке с КМ-целлюлозой (1.0×13 см). После сорбции белка использовали градиент концентрации KCl в среде элюции для десорбции АГ. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час. Ферментативную активность и содержание белка анализировали в каждой фракции объемом 2 мл. Фракции с максимальной активностью фермента объединяли. Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Константу Михаэлиса (Км) определяли методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка.

Электрофоретические свойства ферментного препарата оценивали методом диск-электрофореза в ПААГ по Дэвису. В качестве маркера движения молекул в ходе электрофореза использовали раствор бромфенолового синего. Окрашивание гелей на белок осуществляли 0.5 % кумасси голубым R-250 в течение 60 минут с последующим промыванием 7 % уксусной кислотой. Специфическое проявление АГ было основано на сопряженной реакции в результате переноса водорода от НАДФН на нитротетразолиевый синий при участии феназинметасульфата с образованием диформаза. Среда инкубации включала 200 мМ трис-HCl буфер pH 7.8, 0.5 мМ MnCl₂, 1 мМ НАДФ, 2.2 мг/мл цис-аконитата в 1 М трис-HCl буфере pH

9.5, 0.12 мг/мл нитротетразолиевого синего, 0.18 мг/мл феназинметасульфата и 0.2 мг/мл НАДФ-ИДГ (2 Е/мл).

Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 23.0 с использованием критерия Колмогорова-Смирнова для оценки нормальности распределения переменных. Сравнение значений показателей между группами проводилось с использованием ANOVA или критерия Краскелла-Уоллиса. Парные сравнения проводились с использованием Т-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни. Статистическая значимость определялась с использованием порогового значения $p < 0.05$. Количественные данные представлены в виде среднего значения + стандартное отклонение (SD).

Обсуждение результатов

Для анализа кардиопротекторных свойств ДПК была проведена оценка активности КК-МВ и АсАТ в сыворотке крови животных на фоне диклофенак-индуцированного повреждения миокарда. Кардиотоксичность, вызванная диклофенаком, приводила к значительному повышению активности исследуемых ферментов, что свидетельствует о повреждении клеток миокарда и последующем высвобождении внутриклеточного содержимого в кровотоки (рис. 1). Применение ДПК в дозе 10 мг/кг в качестве кардиопротектора у крыс с индуцированной кардиотоксичностью снижало повреждающее действие диклофенака на ткани сердца и способствовало нормализации активности КК-МВ и АсАТ. Судя по всему, свои позитивные эффекты ДПК оказывала за счет торможения тромбообразования и последующего улучшения кровоснабжения миокарда [11, 15].

Уровень карбонильных остатков аминокислот в белках ткани сердца в группе животных, получавших диклофенак, существенно увеличивался, что, вероятно,

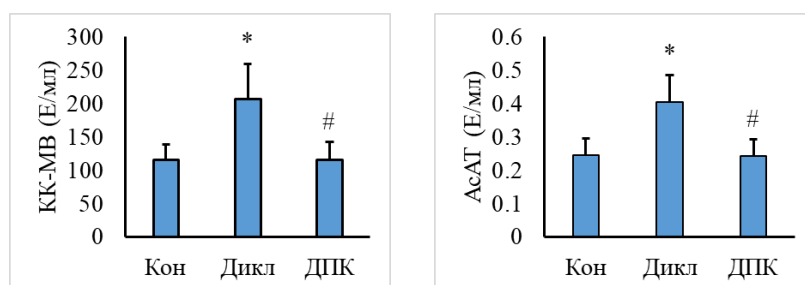


Рис. 1. Показатели активности креатин киназы-МВ (КК-МВ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным повреждением миокарда (Дикл) и животных, которым на фоне развития патологии вводили дипикололиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК). * - $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой; # - $p < 0.05$ по сравнению с группой животных с патологией.

Fig 1. Indicators of the activity of creatine kinase-MB (CK-MB) and aspartate aminotransferase (ASAT) in the blood serum of rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA). * - $p < 0.05$ as compared to the control group; # - $p < 0.05$ as compared to the group of animals with a pathology

отражает усиление процессов свободно-радикального окисления (рис. 2). Наблюдалось также падение активности АГ, выраженной в Е/г сырой массы сердца и Е/мг белка. Применение ДПК в дозе 10 мг/кг способствовало снижению уровня окислительной модификации белков, а также увеличению активности АГ. Данные сдвиги, очевидно, были связаны с уменьшением выраженности окислительного стресса. Из литературы известно, что ДПК способна оказывать ингибирующее действие на железозависимое перекисное окисление липидов и опосредованную медью инактивацию глутатион-редуктазы. Механизм данного эффекта может заключаться в том, что пиридиновое кольцо ДПК имеет неспаренный электрон на атоме азота, и наличие карбоксильных групп во 2-м и 6-м положениях, оттягивающих электронную плотность, усиливает способность соединения принимать электроны. Таким образом, ДПК может забирать электроны у металлов с переходной валентностью, окисляя их и не давая вступать в реакции генерации свободных радикалов [16-18].

Поскольку большую часть активности АГ в клетке составляет её цитоплазматическая фракция [19], для дальнейших исследований было проведено выделение и очистка АГ из цитоплазмы клеток ткани

сердца экспериментальных животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда, получавших ДПК. Ферментный препарат АГ был получен методом фракционирования с использованием ступенчатого повышения концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Степень очистки после данной стадии составила 5.1 раза и 4.8 раза соответственно, в группе животных с патологией и группе животных, получавших наряду с диклофенаком ДПК (таблица 1). На следующей стадии с целью удаления низкомолекулярных примесей очистку ГР производили с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-25. В дальнейшем применяли хроматографию на КМ-целлюлозе, в результате чего удалось получить ферментный препарат со степенью очистки 34.2 из сердца животных, получавших диклофенак и 35.6 раза у крыс, которым вводили ДПК на фоне патологии. В ходе эксперимента было установлено, что в процессе ионообменной хроматографии на колонке с КМ-целлюлозой фермент из сердца исследуемых животных десорбировался в виде максимального пика при нанесении на колонку 35 мл среды элюции 100 мМ KCl. На заключительной стадии очистки белковый раствор подвергали разделению на сефадексе G-150. Применение

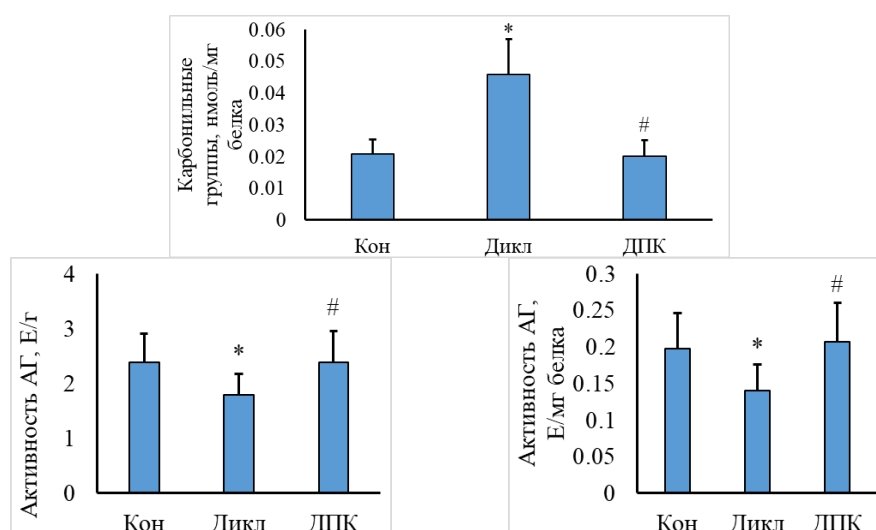


Рис. 2. Уровень карбонильных остатков аминокислот в белках и активность аконитатгидратазы (АГ), выраженная в Е/г ткани и Е/мг белка в сердце контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным повреждением миокарда (Дикл) и животных, которым на фоне развития патологии вводили дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК). * - $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой; # - $p < 0.05$ по сравнению с группой животных с патологией.

Fig 2. The level of carbonyl amino acid residue in proteins and the activity of aconitate hydratase (AH) expressed in U/g of tissue and U/mg of protein in the hearts of rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA). * - $p < 0.05$ as compared to the control group; # - $p < 0.05$ as compared to the group of animals with a pathology.

данной стадии очистки позволило получить очищенные препараты АГ из сердца крыс с патологией и крыс, получавших на фоне диклофенака ДПК, в 120.0 и 122.1 раза соответственно. Конечные ферментные препараты АГ цитоплазматической фракции у животных данных экспериментальных групп имели удельную активность 9.6 и 12.3 Е/мг белка. Очищенный ферментный препарат служил объектом для анализа каталитических и регуляторных свойств.

В ходе работы была осуществлена оценка электрофоретических свойств очищенного ферментного препарата АГ. С помощью специфического окрашивания на активность были обнаружены две формы фермента в гомогенате сердца крыс всех экспериментальных групп с R_f 0.78 и 0.89. После электрофореза и специфического окрашивания на активность в цитоплазматической фракции была обнаружена одна форма АГ с R_f 0.78. Вторая

полоса отсутствовала или визуализировалась в следовых количествах, что могло быть связано с незначительным перекрестным загрязнением митохондриальной формой. При неспецифическом окрашивании очищенного препарата АГ у крыс всех экспериментальных групп проявлялась одна основная полоса с R_f 0.78, соответствующая цитоплазматической форме фермента.

В ходе проведенного исследования методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка удалось вычислить Константу Михаэлиса (Км) АГ по отношению к цитрату, которая составляла в контроле 66 мкМ, у животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда – 133 мкМ, а у крыс, которым на фоне развития патологии вводили ДПК – 83 мкМ (рис 3). Также для фермента из сердца животных данных групп был найдена Км по отношению к изоцитрату, которая составила соответственно 55, 125

Таблица 1. Очистка аконитатгидратазы из сердца крыс контрольной группы (Кон), животных с диклофенак-индуцированным повреждением миокарда (Дикл), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили дипикололиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК).

Table 1. Purification of aconitate hydratase from the hearts of rats of the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DCA)

Стадия очистки	Группа животных	Общая активность во фракции, Е	Количество белка во фракции, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитоплазматическая фракция	Кон	4.62±0.70	45.00±8.40	0.10±0.02	100	1.00
	Дикл	3.45±0.51	41.00±6.22	0.08±0.01	100	1.00
	ДПК	4.67±0.82	44.28±7.21	0.11±0.02	100	1.00
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	Кон	2.32±0.41	4.55±1.12	0.51±0.09	50.20	5.10
	Дикл	1.72±0.26	4.16±1.06	0.41±0.08	49.85	5.13
	ДПК	2.39±0.48	4.49±0.86	0.53±0.11	51.18	4.82
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Кон	2.30±0.32	4.53±1.01	0.51±0.08	49.80	5.10
	Дикл	1.68±0.30	3.95±0.82	0.43±0.06	48.69	5.38
	ДПК	2.31±0.46	4.40±0.91	0.53±0.12	49.46	4.82
Хроматография на КМ-целлюлозе	Кон	1.64±0.28	0.40±0.05	4.10±0.75	35.60	41.00
	Дикл	1.18±0.25	0.34±0.04	3.47±0.65	34.20	43.38
	ДПК	1.68±0.32	0.37±0.05	4.54±0.79	35.60	42.18
Гель-хроматография на G-150	Кон	0.73±0.14	0.06±0.02	12.2±2.15	15.69	122.00
	Дикл	0.48±0.09	0.05±0.01	9.60±2.09	13.91	120.00
	ДПК	0.74±0.17	0.06±0.02	12.33±2.39	15.85	122.09

и 59 мкМ (рис. 3). Наблюдаемое снижение сродства АГ к цитрату и изоцитрату при патологии, по-видимому, было сопряжено со снижением активности фермента, происходящим в результате повреждения его железо-серного кластера под действием АФК. В свою очередь, восстановление сродства АГ к цитрату и изоцитрату могло происходить в результате улучшения окислительного статуса в ткани сердца под действием ДПК и восстановления активности АГ.

При определении температурного оптимума было найдено, что максимальная активность АГ, выделенной из цитоплазмы клеток сердца крыс с диклофенак-индуцированным поражением миокарда, проявляется при 35 °С – более низкой температуре, чем у фермента животных контрольной группы (рис. 4). Также показано снижение энергии активации

для АГ из сердца крыс с патологией, рассчитанной из графика Аррениуса в интервале температур 10-40 °С. Анализ зависимости скорости АГ-реакции от концентрации ионов водорода показал, что АГ цитоплазматической фракции сердца крыс с патологией характеризуется сдвигом рН оптимума в кислую сторону. Данные изменения могут являться следствием накопления восстановительных эквивалентов при угнетении окислительного фосфорилирования на фоне ишемии миокарда, вызванной активизацией тромбоза в результате введения диклофенака. Применение ДПК приводило к сдвигу температурного и рН оптимума в направлении контроля, что могло быть связано с нормализацией энергетического обмена за счет антитромботического действия ДПК и улучшения перфузии миокарда.

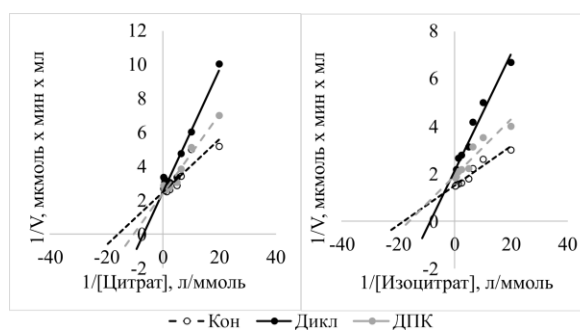


Рис. 3. Зависимость скорости реакции, катализируемой аконитатгидратазой, от концентрации цитрата и изоцитрата, представленная в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка, у контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда (Дикл), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК).

Fig 3. Dependence (shown using the Lineweaver–Burk method of double inverse coordinates) of the rate of reaction catalysed by aconitate hydratase on the concentration of citrate and isocitrate in rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA).

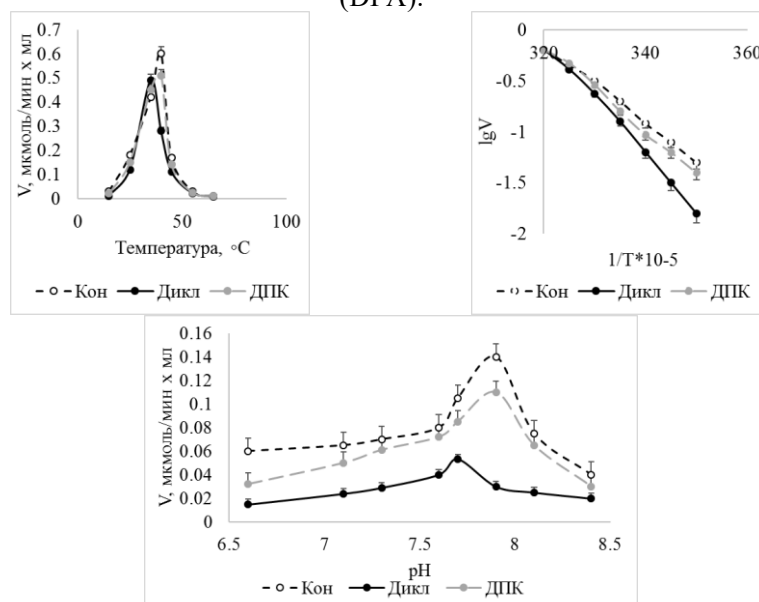


Рис. 4. Зависимость скорости реакции, катализируемой аконитатгидратазой, от температуры, концентрации ионов водорода, а также график Аррениуса в интервале температур 10–40 °С для фермента из сердца контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда (Дикл), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК).

Fig 4. Dependence of the rate of reaction catalysed by aconitate hydratase on the temperature and the concentration of hydrogen ions. Arrhenius graph in the temperature range of 10–40 °C for the enzyme from the hearts of rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA).

Как известно, при ишемии миокарда, в том числе вызванной тромбообразованием на фоне применения НПВП, важную роль в защите от окислительного стресса играет GSH, который в ходе восстановления реактивных молекул окисля-

ется до GSSG. В связи с этим, актуальным является анализ регуляторного влияния GSH на активность АГ из сердца крыс при диклофенак-индуцированном повреждении миокарда и введении ДПК. В ходе работы было выяснено, что активность фермента цитоплазматической

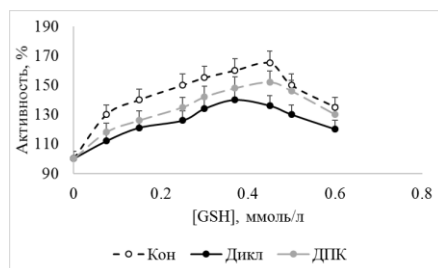


Рис. 5. Воздействие восстановленного глутатиона (GSH) на активность цитоплазматической аконитатгидратазы сердца контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда (Дикл), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК).

Fig 5. Influence of reduced glutathione (GSH) on the activity and oxidised glutathione (GSSG) on the activity of cytoplasmic aconitate hydratase in the hearts of rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA).

фракции из сердца крыс с патологией увеличивается с возрастанием концентрации GSH до 0.4 мМ, а из сердца крыс, получавших наряду с диклофенаком ДПК – до концентрации GSH 0.45 мМ (рис. 5). При этом, активность АГ из сердца крыс с патологией повышается на 38 %, а активность фермента из сердца крыс, получавших на фоне поражения миокарда ДПК – на 50 %, что представляет собой более близкие к показателям контрольной группы значения активности.

Таким образом, с использованием методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексах G-25 и G-150, и хроматографии на КМ-целлюлозе был получен высокоочищенный ферментный препарат АГ, который использовали для оценки каталитических и регуляторных свойств фермента в условиях воздействия ДПК на фоне диклофенак-индуцированного повреждения миокарда. Полученные данные показали, что ДПК изменяет ряд каталитических и регуляторных параметров АГ у животных с патологией, что сопровождается сдвигами соответствующих значений в направлении показателей контрольной группы. Выявленные изменения, судя по всему, были связаны с нормализацией оксидативного статуса, обусловленного улучшением перфузии миокарда за счёт антитромботического действия ДПК, а также способности данного соединения

тормозить процессы свободнорадикального окисления, что приводило к восстановлению активности и свойств АГ.

Заключение

В результате проведенных исследований был получен ферментный препарат АГ цитоплазматической фракции из сердца животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда со степенью очистки 120.0 раза, а также из сердца крыс, получавших на фоне патологии ДПК, со степенью очистки 122.1 раза, с применением методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексах G-25 и G-150, и ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе. Показано, что введение ДПК крысам с диклофенак-индуцированным поражением миокарда способствовало восстановлению сродства АГ к цитрату и изоцитрату. Помимо этого, происходило изменение в направлении контроля таких параметров ферментативной реакции, как температурный и рН-оптимум, а также энергия активации. Отмечено, что при добавлении в реакционную среду GSH активность АГ из сердца крыс, которым вводили ДПК на фоне патологии, увеличивалась более существенно, по сравнению с показателями при диклофенак-индуцированном повреждении миокарда. Изменения свойств АГ могут быть связаны с нормализацией редокс-статуса

в условиях улучшения перфузии миокарда за счёт проявления ДПК антиромботической активности, а также в результате наличия антиоксидантных свойств у данного соединения.

Список литературы/References

1. McGettigan P., Henry D. *PLoS Med*, 2013; 10: 1001388. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001388>
2. Turgut D., Mustafa M., Huseyin F.G., *The American Journal of Emergency Medicine*, 2021; 560: 560-566. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.11.022>
3. Hanna V.S., Hafez E.A.A. *J Adv Res*, 2018; 11: 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>
4. Mitchell J.A., Kirkby N.S. *British Journal of Pharmacology*, 2019; 176: 1038-1050. <https://doi.org/10.1111/bph.14167>
5. Hausenloy D.J., Yellon D.M. *J Clin Invest*, 2013; 123: 92-100. <https://doi.org/10.1172/JCI62874>
6. Tan M., Yin Y., Ma X., Zhang J., Pan W., Tan M., Zhao Y., Yang T., Jiang T., Li H. *Cell Death Dis*, 2023; 14: 131. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05645-y>
7. Won S.J., Kim J.E., Cittolin-Santos G.F., Swanson R.A. *Journal of Neuroscience*, 2015; 35: 7143-7152. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4826-14.2015>
8. Vázquez-Meza H., Vilchis-Landeros M.M., Vázquez-Carrada M., Uribe-Ramírez D., Matuz-Mares D. *Antioxidants*, 2023; 12: 834. <https://doi.org/10.3390/antiox12040834>
9. Matasova L.V., Popova T.N. *Biochemistry (Moscow)*, 2008; 73: 957-964. <https://doi.org/10.1134/S0006297908090010>

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.

10. Kayani K.F., Shatery O.B.A., Mohammed S.J., Ahmed H.R., Hamarawf R.F., Mustafa M.S. *Nanoscale Adv*, 2025; 7: 13-41. <https://doi.org/10.1039/D4NA00652F>
11. Ohsugi T., Ikeda S., Sumi H. *Food Science and Technology Research*, 2005; 11: 308-310. <https://doi.org/10.3136/fstr.11.308>
12. None N.N., Ahmed M.M., *Journal of Contemporary Clinical Practice*, 2025; 11: 286-291. <https://doi.org/10.61336/jccp/25-05-37>
13. Ma N., Yang Y., Liu X., Li S., Qin Z., Li J. *Journal of Proteomics*, 2020; 215: 103631. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103631>
14. Reznick A.Z., Packer L. *Methods Enzymol*, 1994; 233: 357-363. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)
15. Mawatari K., Atsumi M., Nakamura F., Yasuda M., Fukuuchi T., Yamaoka N., Kaneko K., Nakagomi K., Oku N., *International Journal of Tryptophan Research*, 2019; 12: 1178646919852120. <https://doi.org/10.1177/1178646919852120>
16. Murakami K., Tanemura Y., Yoshino M. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003; 14: 99-103. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00252-8)
17. Murakami K., Yoshino M. *Biomedical Research*, 1999; 20: 321-326. <https://doi.org/10.2220/biomedres.20.321>
18. Murakami K., Ueda T., Morikawa R., Ito M., Haneda M., Yoshino M. *Biomedical Research*, 1998; 19: 205-208. <https://doi.org/10.2220/biomedres.19.205>
19. Medvedeva L.V., Popova T.N., Artyukhov V.G., Matasova L.V., Akatova R.V. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2002; 134: 130-134. <https://doi.org/10.1023/A:1021171811902>

Информация об авторах / Information about the authors

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

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

С.А. Олейник – аспирант кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Д.Р. Беспалов – студент кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

T.N. Popova – Dean of the Faculty of Medicine and Biology, grand Ph.D (biology), department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

S.A. Oleynik – post-graduate student, department of medical biochemistry, molecular and cell biology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

D.R. Bepalov – student, department of medical biochemistry, molecular and cell biology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 10.09.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 10.09.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.112.083

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13445

Очистка транскрипционного фактора YihW из пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 с использованием аффинной хроматографии на спин-колонок

Татьяна Александровна Бессонова^{1,2✉}, Александр Евгеньевич Колонский³,
Егор Сергеевич Трубников⁴, Дмитрий Сергеевич Коршунов⁴,
Анна Михайловна Дука^{3,5}, Михаил Сергеевич Гельфанд³,
Мария Николаевна Тутукина^{1,2,3}

¹ Институт биофизики клетки РАН (ФИЦ ПНЦБИ РАН), Пушкино, Россия,
tatianabessonova66@gmail.com✉

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland

Аннотация. Транскрипционные факторы бактерий в силу своей токсичности трудно поддаются экспрессии, а в силу склонности к олигомеризации - очистке, и для каждого белка требуется индивидуальный подбор оптимальных условий. В работе был создан вектор для суперпродукции транскрипционного фактора YihW (CsqR) из пробиотического штамма *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) и подобраны оптимальные условия для его синтеза в гомологичной экспрессионной системе: экспрессия в клетках штамма BL21(DE3)-Codon Plus-RIL; индукция 50мкМ IPTG в течение 5 часов при 37°C. Была разработана схема быстрой и эффективной очистки YihW с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA смоле, представленной в виде колонок для центрифугирования, сочетающая в себе условия для очистки белков в нативных и денатурирующих условиях, с последующим ступенчатым диализом. Разработанный нами метод позволяет получить гомогенный белковый препарат 95% чистоты, который является функционально активным. Активность полученного препарата YihW была подтверждена с помощью оценки эффективности его связывания с ДНК-мишенью путем электрофоретического разделения ДНК-белковых комплексов в полиакриламидном геле.

Ключевые слова: аффинная хроматография на Ni-NTA сорбенте, суперпродукция, YihW (CsqR), пробиотический штамм *E. coli*

Благодарности: Работа выполнена при поддержке РНФ 24-14-00276.

Для цитирования: Бессонова Т.А., Колонский А.Е., Трубников Е.С., Коршунов Д.С., Дука А.М., Гельфанд М.С., Тутукина М.Н. Очистка транскрипционного фактора YihW из пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 с использованием аффинной хроматографии на спин-колонок // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 770-781. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13445>

Original article

Purification of the YihW Transcription Factor from the Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917 Using Affinity Chromatography on Spin Columns

Tatiana A. Bessonova^{1,2✉}, Alexander E. Kolonsky³, Egor S. Trubnikov⁴,
Dmitry S. Korshunov⁴, Anna M. Duk^{3,5}, Mikhail S. Gelfand³, Maria N. Tutukina^{1,2,3}

¹ Institute of Cell Biophysics of RAS (FRC PSCBR RAS), Pushchino, Russian Federation,

tatianabessonova66@gmail.com[✉]

²Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russian Federation

³Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

⁴M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

⁵École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland

Abstract. Due to their toxicity, bacterial transcription factors are difficult to be expressed, while their ability to form oligomers makes purification challenging. For each such protein, an individual approach is usually needed. Here, a vector for overproduction of the YihW (CsqR) from probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) transcription factor was constructed, and optimal conditions for its synthesis in homologous expression system were selected: expression in BL21(DE3)-Codon Plus-RIL; induction with 50 μ M IPTG for 5 hours at 37°C. A rapid and effective purification scheme was developed, based on the affinity chromatography on spin columns with the Ni-NTA sorbent and combining native and denaturing conditions, followed with step dialysis. The developed approach allows obtaining homogenous, 95% pure, functionally active protein. Activity of the produced YihW was confirmed using complex formation with its DNA target and subsequent electrophoretic separation of the DNA-protein complexes in polyacrylamide gel.

Keywords: Ni-NTA affinity chromatography, recombinant protein production, YihW (CsqR), probiotic *E. coli*
Acknowledgments: the work was carried out with the support of the Russian Science Foundation 24-14-00276.

For citation: Bessonova T.A., Kolonskiy A.E., Trubnikov E.S., Korshunov D.S., Dukat A.M., Gelfand M.S., Tutukina M.N. Purification of the YihW Transcription Factor from the Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917 Using Affinity Chromatography on Spin Columns. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 770-781. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13445>

Введение

Белковые регуляторы (факторы транскрипции) играют важную роль в обеспечении оптимальной экспрессии генов и быстрого ответа клеток на сигналы окружающей среды. Особенно это важно для бактерий, процессы транскрипции и трансляции у которых тесно сопряжены во времени и пространстве и которым необходимо уметь быстро адаптироваться к новым условиям при попадании, например, в организм хозяев. Для понимания механизмов бактериальных адаптаций и разработки новых антимикробных препаратов нужно иметь представление о функциях как можно большего числа факторов транскрипции. Их функции изучают, в первую очередь, с использованием таких методов, как получение кристаллов белков и их последующий рентгеноструктурный анализ, а также электрофорез с задержкой в геле для оценки взаимодействия фактора транскрипции с его мишенью на ДНК. Все эти подходы требуют получения большого количества препарата исследуемого белка, что в случае факторов транскрипции затруднительно из-за их токсичности

для клеток-суперпродуцентов [1, 2]. Например, транскрипционный фактор FadR (регулятор синтеза жирных кислот) при суперпродукции значительно замедляет рост клеточной культуры и меняет морфологию бактерий даже при очень низких концентрациях IPTG (10 мкМ) за счёт накопления повышенного количества фосфолипидов [3]. Для другого транскрипционного фактора, CsgD (отвечает за синтез определенного вида пилей для формирования биопленок), очистка даже регуляторного домена оказалась возможной только при индукции его синтеза при низкой температуре (20°C) [4].

Транскрипционный фактор YihW (CsqR) интересен тем, что он является локальным регулятором недавно открытого пути деградации сульфосахаров у *Escherichia coli* штамма K-12 MG1655. Было предсказано, что YihW действует как репрессор для кластера *yih*-генов, а сульфохиновоза (сульфоглюкоза) работает как эффекторная молекула [5, 6]. Кроме того, он может участвовать в регуляции альтернативного пути утилизации лактозы, наличие которого у кишечной палочки само по себе было неожиданно [5].

YihW (CsqR) относится к семейству DeoR ДНК-связывающих белков, которое характеризуется присутствием ДНК связывающего N-домена с мотивом спираль-поворот-спираль (НТН) и С-концевого домена, связывающего эффектор – в данном случае, сульфохинозону. Получение и очистка белков этого семейства, как и других транскрипционных факторов бактерий, сопряжена с рядом трудностей.

В частности, в одной из первых работ по очистке белков этого семейства [7] для получения препарата GlpR (репрессор глицерол-3-фосфатного регулона) авторы использовали сложную многоступенчатую схему, включающую очистку на полиэтиленимине, фракционирование сульфатом аммония и последующую хроматографию на фосфоцеллюлозе и ДЭАЭ-сефадексе. В результате был получен препарат высокой степени очистки, но в очень маленьком количестве (6 мг белка из 4 литров культуры). Авторы другого исследования при попытке очистить белок DeoR (репрессор оперона дезоксирибозы) отмечали высокую токсичность его высоких концентраций для клеток и низкую естественную экспрессию данного регулятора [8]. Поэтому для получения большего количества белка в растворимой фракции была использована конструкция с дополнительным регулируемым промотором, позволяющим подавлять экспрессию гена целевого белка до направленной индукции. Это позволило получить 4% белка в растворимой фракции. Очистку проводили при помощи высаливания разными концентрациями сульфата аммония с последующей катионнообменной хроматографией на фосфоцеллюлозе и гель-фильтрацией на Сефадексе G200. Несмотря на многостадийную очистку, чистота белкового препарата составила всего 80%.

В более позднем исследовании DeoR из *Bacillus subtilis* был очищен уже при помощи аффинной хроматографии на Ni-

NTA сефарозе, но с интересными модификациями протокола, такими как осаждение ДНК/РНК при помощи стрептомицин сульфата [9]. Аффинная хроматография на никель-содержащих твердофазных носителях (сефароза, агароза, магнитные частицы) позволяет получить высокоочищенный препарат белка в фактически в один этап и легко масштабируется. На первом этапе происходит специфическое связывание остатков гистидина (гистидиновой метки или “тага”) белка с ионами никеля, ковалентно пришитыми к носителю, а затем, после серии промывок от неспецифически адсорбированных белков, целевой белок снимается с носителя высокими концентрациями имидазола, которые замещают гистидин. Тем не менее, выход чистого DeoR в этом случае был очень мал – с трех литров культуры бактерий-суперпродуцентов было получено всего 40 мг препарата белка [9], хотя его чистота была существенно выше и составляла около 95%.

Еще одним вариантом аффинной хроматографии для очистки регулятора семейства DeoR может быть хроматография с использованием в качестве метки белка, связывающего мальтозу (maltose binding protein, MBP). Таким образом была проведена очистка регулятора транспорта и утилизации L-аскорбата UlaR [10]. Использование MBP позволило увеличить растворимость рекомбинантного белка и усилить эффективность связывания с носителем по сравнению с Ni-NTA. Однако, как и в случае использования в качестве метки глутатионсульфотрансферазы, MBP за счет своего размера (около 40 кДа) может повлиять на структуру белка и его функциональную активность. Поэтому необходимо проведение дополнительного ферментативного отщепления MBP и очистки от MBP и протеазы, что усложняет и удлинняет протокол, приводя к снижению выхода целевого белка. Данные о способах очистки

K-12	1	MSLTETLTGNPRHDQLMLIAERGYMNIIDELANLLDVSTQTVRRDIRKLEQGLITRHHGG	60
Nissle	1	MS+ E+TGNPRHDQL+ LIAERGYMNI+ELA LLDVSTQTVRRDIRKLEQGLITRHHGG	60
K-12	61	AGRASSVNTAFECREVSQTEKKATAEAVADYIPDGSTIFITIGTVEHVARALLNNHH	120
Nissle	61	AGR SSV+NTAFECRE+S T EK+ATAEAVADY+P+ T+FITIGTIVE VARALLN	120
K-12	121	LRIITNSLRVAHLYHNPRFEVMPGGTLRHNSGIIGPSAASFVADFRADYLVTSVGAI	180
Nissle	121	LRIITNSLRVA ILY N EVMPGGTLRHNN GIIGP A F+ FRADYL+TS+GAI	180
K-12	181	ESDGLMEFDVNEANVVKTMMAHARNILLVAHDKYHASAAVEIGNVAQVTALFTDELPP	240
Nissle	181	E DG L+EFDVNEA V +TM+ HARN LLVADHTK+ ASA AV IGN V A FTD PP	240
K-12	241	AALKSRQLQDSQIEIILPQED 260	
Nissle	241	+ L + +E+++ +++ NSFCQLSEENVELVVAEQE 260	

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей YihW (CsqR) из штаммов *E. coli* K-12 MG1655 и Nissle 1917 с помощью инструмента BLAST. Красными прямоугольниками выделены аминокислоты, отвечающие за взаимодействие белка с лигандом [13].

Fig. 1. Comparison of the *E. coli* K-12 MG1655 and Nissle 1917 YihW (CsqR) amino acid sequences using the BLAST tool. The amino acids responsible for the interaction of the protein with the ligand are highlighted in red rectangles [13].

других транскрипционных факторов семейства DeoR в *E. coli* на настоящий момент отсутствуют.

Штамм *E. coli* Nissle 1917 (EcN) – один из пробиотических штаммов кишечных палочек, который имеет такой же метаболический профиль, как и другие штаммы *E. coli*, но не несёт в своем геноме факторов патогенности и не продуцирует энтеротоксинов. EcN является основным компонентом препарата «Мутафлор», который активно используют для лечения нарушений кишечного микробиома [11, 12]. Количество генов, входящих в *yih*-кассету, у EcN меньше, чем у K-12 MG1655, для которого было показано участие этих генов в метаболизме сульфосахаров – всего 4 из 10. При этом по результатам сравнительно-геномного анализа YihW (CsqR) из Nissle 1917 имеет всего 72% сходства с белком из *E. coli* K-12 (рис. 1). Ранее нами уже был очищен белок CsqR из лабораторного штамма *E. coli* K-12 MG1655 с помощью стандартного протокола аффинной хроматографии [13].

Задачей настоящего исследования было получение очищенного препарата белка YihW (CsqR) из *E. coli* Nissle 1917 и оценка его функциональной активности для дальнейшего изучения механизмов функционирования сульфогликолиза и его регуляции в пробиотическом штамме.

Экспериментальная часть

Создание экспрессионного вектора.

Экспрессионный вектор был создан на основе pGEMΔXba (экспрессионный вектор на базе pGEMEX1 (Promega), AmpR) [14]. Вектор содержит промотор РНК-полимеразы фага Т7, для индукции транскрипции с которого используется изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG). Для амплификации гена *yihW* (*csqR*) с геномной ДНК штамма *E. coli* Nissle 1917 (GenBank NZ_CP082949.1) были использованы олигонуклеотиды, содержащие сайты узнавания рестриктазы XbaI (выделены жирным шрифтом) (табл. 1). Для возможности очистки белка с помощью аффинной хроматографии на Ni (Ni-нитрилотриуксусная кислота) – NTA смоле на 3'-конец мРНК *yihW* (*csqR*) была добавлена последовательность, кодирующая шесть последовательных гистидинов (his-tag). Праймеры были сконструированы для двух вариантов векторной вставки: **reg** – кроме собственного гена *yihW* (*csqR*) вставка имеет на 5'-конец мРНК собственный сайт связывания регуляторных белков и рибосомы; **noreg** – только вставка гена *yihW* (*csqR*) непосредственно под Т7-промотор. Это было сделано для того, чтобы выключать транскрипцию гена *yihW* (*csqR*) при суперпродукции белка в клетке, тем самым позволяя транскрипционному фактору

Таблица 1. Праймеры для амплификации
Table 1. Primers for amplification.

Название олигонуклеотида (праймера)	Последовательность олигонуклеотида
Nissle_YihW_Fwd_reg	5' – ATGCTCTAGATGGTAAACATCTACCG –3'
Nissle_YihW_Fwd_noreg	5' – AAATTCTAGACATCTACCGAGGAG – 3'
NissleYihW_Rev_his	5'- AGTTTCTAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGGGATACTTCTTGCTCGGCA- 3'

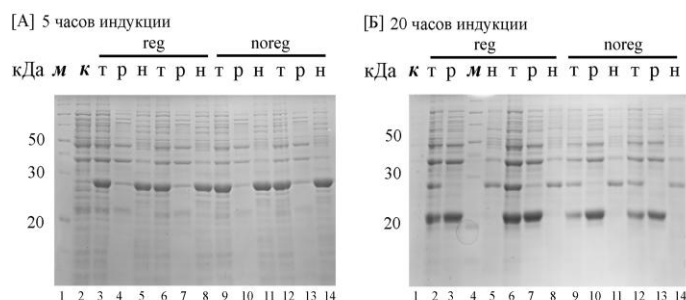


Рис. 2. Подбор условий суперпродукции YihW (CsqR) из *E. coli* Nissle1917. Приведены данные для штамма BL21 (DE3) RIL. [А] – пробы, отобранные после 5 часов индукции (дорожки 3-5, 9-11 – 50 мкМ IPTG, 6-8, 12-14 – 100мкМ IPTG); [Б] – пробы, отобранные после 20 часов индукции (дорожки 2,3,5 и 9-11 – 50 мкМ IPTG, 6-8, 12-14 – 100мкМ IPTG). К – контроль до индукции, М – маркер белкового веса, Т – тотальная фракция, Р – растворимая фракция, Н – нерастворимая фракция.

Fig. 2. Search for the optimal conditions for the overproduction of YihW (CsqR) from *E. coli* Nissle 1917. Data for the BL21 (DE3) RIL strain are presented. [A] – samples taken after 5 hours of induction (tracks 3-5, 9-11 – 50 mkM IPTG, 6-8, 12-14 – 100 mkM IPTG); [B] – samples taken after 20 hours of induction (tracks 2,3,5 and 9-11 – 50 mkM IPTG, 6-8, 12-14 – 100 mkM IPTG). K – control before induction, M – protein weight marker, T – total fraction, P – soluble fraction, H – insoluble fraction.

накапливаться преимущественно в растворимой фракции клеточного лизата, как это было сделано в [8, 15]. Полученные векторы были названы pGEM_YihW_Nissle_reg и pGEM_YihW_Nissle_noreg и проверены на отсутствие мутаций прямым секвенированием по Сенгеру (Евроген, Россия).

Штамм *E. coli* Nissle 1917 был получен из препарата «Мутафлор» (Ardeypharm GmbH, Германия) посредством высева сначала в жидкую, а потом на твердую среду LB (Luria-Bertani (10 г/дм³ триптона, 5 г/дм³ дрожжевого экстракта, 10 г/дм³ NaCl 10, опционально агар 20 г/дм³)) с последовательным разбавлением и отбором чистых колоний. Для подтверждения принадлежности высеянного штамма к *E. coli* Nissle 1917 было

проведено полногеномное секвенирование (PRJNA1176130 ID:1176130). В качестве референсного генома использовали геном *Escherichia coli* Nissle 1917 из базы данных GenBank (идентификатор NZ_CP082949.1).

Суперпродукция белка YihW (CsqR). Для подбора оптимальных условий индукции белка YihW в гомологичной системе были использованы штаммы *E. coli* BL21*(DE3) и BL21(DE3)-Codon Plus-RIL, в геноме которых содержится ген РНК-полимеразы фага Т7. Клетки трансформировали с помощью химической трансформации векторами pGEM_YihW_Nissle_reg и pGEM_YihW_Nissle_noreg и растили на твердой среде LB в присутствии 200 мкг/мл ампицилина (2S,5R,6R)-6- [(R)-

2-амино-2-фенилацетамидо]-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]-гептан-2 карбоновая кислота в виде тригидрата натриевой соли) при 37°C до появления отчетливо видимых колоний (около 16 часов). Трансформанты пересеивали в жидкую стерильную среду LB, содержащую 200 мкг/см³ ампициллина, и растили при 37°C и постоянном перемешивании 121 об/мин на воздушной бане (Bio-san, Латвия) около 16-ти часов. 1 см³ полученных культур переносили в 200 мл жидкой стерильной среды LB или TB (Terrific Broth (12 г/дм³ казеинового пептона 24 г/дм³ дрожжевого экстракта, 0.4% глицерина, 0.17 М КН₂РO₄, 0.72 М К₂НРO₄)) с 200 мкг/см³ ампициллина и растили при перемешивании 125 об/мин на воздушной бане и 37°C до добавления индуктора IPTG на значении ОП₆₀₀ = 0.15-0.2. Для оптимизации протокола использовали различные концентрации IPTG: 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ, и разное время продолжительности индукции (3, 5 и 16 часов). Разделение белков клеточного лизата на растворимую и нерастворимую фракцию проводили с помощью реактива BugBuster (Millipore, США). Уровень экспрессии белка оценивали при помощи электрофореза в денатурирующем 12.5% полиакриламидном геле (ПААГ) с окрашиванием Кумасси R-250 по стандартному протоколу. Результаты подбора условий индукции представлены на рис. 2. Клетки с суперпродуцированным YihW осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 минут при +4°C на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия).

Никель-аффинная хроматография на спин-колонках. Для быстрой очистки белка YihW (CsqR) использовали набор Ni-NTA Spin Kit (50) (Qiagen, Германия). В состав набора входят колонки для центрифугирования, содержащие силикагелевую Ni-NTA смолу, которая сочетает в себе все преимущества Ni-NTA носителей и силикагеля, минимизирующего не-

специфические гидрофобные взаимодействия. Ni-NTA силикагелевая смола может быть использована для очистки белков как в нативных, так и в денатурирующих условиях [16]. В данной работе мы модифицировали протокол производителя для очистки в денатурирующих условиях [17], что позволило увеличить выход целевого рекомбинантного белка. Для этого осадок клеток, содержащих целевой белок, тщательно ресуспендировали в растворе стерильного однократного фосфатно-солевого буфера (1xPBS: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1.8 мМ КН₂РO₄, pH 7.4), снова центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 минут при +4°C на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия), супернатант убирали. К осадку добавляли 10 см³ 1xPBS, содержащего 1 мМ PMSF (фтор(фенил)метилсульфонил) и 1 мМ DTT (1,1,1-трихлор-2,2-бис(4-хлорфенил)этан), тщательно перемешивали и подвергали обработке ультразвуком (QSonica Sonicator Q125, США) в течение 15 минут в следующем режиме: 10 секунд пульс, 20 секунд выключен, 45% интенсивности. После обработки ультразвуком образцы центрифугировали при 12500 об/мин 10 минут на настольной центрифуге (MiniSpin Plus, Германия) при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сохраняли при +4°C для дальнейшего нанесения на гель для оценки растворимой фракции лизата, а осадок хорошо перемешивали в 1x PBS, содержащем 1% Triton X-100 (2-[4-(2,4,4-триметилпентан-2-ил)фенокси]этанол), 1 мМ DTT (дитиотрейтол) и 1 мМ PMSF и снова центрифугировали 12 500 об/мин 10 минут на MiniSpin Plus при комнатной температуре. Надосадочную жидкость убирали, а осадок растворяли в 2 мл буфера для нанесения (50 мМ NaH₂РO₄, 300 мМ NaCl, 5 мМ имидазол (1Н-имидазол), 8 мМ мочевины (диамид угольной кислоты), pH 8.0) и наносили на предварительно уравновешенную спин-колонку. Колонку

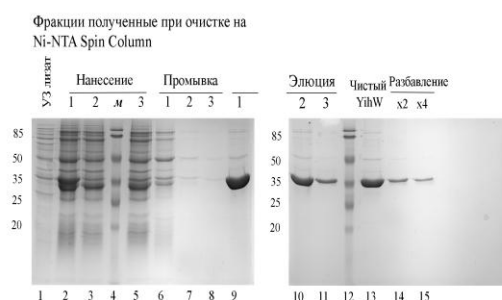


Рис. 3. Фракции, полученные в процессе очистки белка YihW (CsqR) с помощью сорбции на Ni-NTA носитель. Описание фракций приведено над дорожками. На дорожки 4 и 12 нанесен маркер молекулярного веса.

Fig. 3. Fractions obtained during the purification of the YihW (CsqR) protein by sorption onto a Ni-NTA carrier. The fractions are described above the tracks. A molecular weight ladder was loaded onto the tracks 4 and 12.

уравновешивали 600 мкл буфера для нанесения (50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 5мМ имидазол, 8М мочевины, pH 8.0) при 2900 об/мин 2 минуты (на центрифуге Eppendorf MiniSpin Plus). Далее наносили 600 мкл подготовленного образца, центрифугировали при 1600 об/мин 2 минуты, добавляли остатки образца и центрифугировали еще 5 минут при 1000 об/мин. Если не весь образец успевал проходить через колонку, то центрифугировали ещё 2 минуты при 1300 об/мин (на центрифуге Eppendorf MiniSpin Plus). Двойное нанесение образца продиктовано тем, что объем образца после обработки ультразвуком вдвое превышал объем колонки. Данный этап позволяет увеличить количество сорбированного белка и, как следствие, его конечную концентрацию в элюате, что избавляет от необходимости в дополнительном этапе концентрирования очищенного препарата. Далее колонку промывали промывочным буфером 3 раза (50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 20мМ имидазол, 8М мочевины, pH 8.0) центрифугированием 2000 об/мин по 2 минуты (Eppendorf MiniSpin Plus). Связавшийся с колонкой белок элюировали 200 мкл буфера (50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 500мМ имидазол, 8М мочевины, pH 8.0) с последующим центрифугированием в течение 2 минут 2900 об/мин 2-3 раза. После каждого акта центрифугирования

фракции собирали для визуального анализа в денатурирующем 12.5% ПААГ, которые представлены на рис. 3 (Дорожки 1-11). Собранные после элюции фракции объединяли в одну и последовательно диализовали (мембрана CelluSep 3кДа, США) против буферов состава: (1) 50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 6М мочевины, pH 8.0; (2) 50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 4М мочевины, pH 8.0; (3) 50мМ NaH_2PO_4 , 300мМ NaCl , 2М мочевины, pH 8.0 при $+4^\circ\text{C}$ с постоянным перемешиванием минимум по 4 часа (каждый акт диализа). Наличие белка в пробах после диализа проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12.5% ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси R-250 по стандартному протоколу (рис. 3 дорожка 13). Количественную оценку содержания белка во фракциях проводили при помощи спектрофотометра Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США).

Оценка функциональной активности полученного препарата. Функциональную активность YihW (CsqR) оценивали методом электрофореза с задержкой в геле (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA), как описано в [18], по его способности связываться с основной мишенью в геноме – межгенной областью, которая находится между оперонами *yihUTSR* и *yihVW* (кратко – область *yihU/V*) и присутствует как в геноме штамма K-12, так и в геноме штамма EcN. Для получения

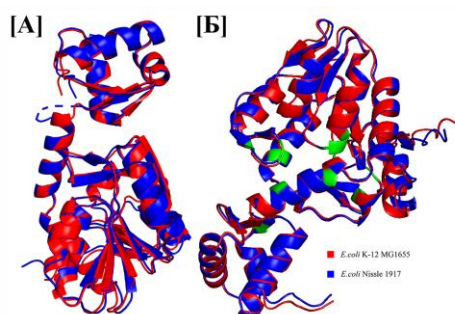


Рис. 4. [А] Наложение структур YihW (CsqR) из *E. coli* K-12 и *E. coli* Nissle 1917.

Структура YihW (CsqR) из *E. coli* K-12 загружена из базы данных AlphaFold [<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P32144>]. Для YihW (CsqR) из *E. coli* Nissle 1917 модель была предсказана на сервере AlphaFold [<https://alphafoldserver.com/> дата обращения 2025-04-16_21:53] с параметрами по умолчанию. На панели [Б] зеленым цветом указаны ключевые аминокислоты, вовлеченные во взаимодействие белка с лигандом [13].

Fig. 4. [A] Superposition of YihW (CsqR) structures from *E. coli* K-12 and *E. coli* Nissle 1917. The YihW (CsqR) structure from *E. coli* K-12 was downloaded from the AlphaFold database [<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P32144>]. For YihW (CsqR) from *E. coli* Nissle 1917, the model was predicted on the AlphaFold server [<https://alphafoldserver.com/> accessed 2025-04-16_21:53] with default parameters. Panel [B] shows in green the key amino acids involved in the protein-ligand interaction [13].

фрагментов ДНК, содержащих регуляторную область *yihU/V* из EcN использовали универсальные для *E. coli* праймеры для этой области: *yihU/V_F_uni* 5'-CAATARATTGYTMGCCATTGG-3' и *yihU/V_R_uni* 5'-KGTКАТАССУACRCAWGCAA-3'. Реакцию амплификации проводили с помощью готовой смеси для ПЦР 5X ScreenMix (Евроген, Россия) с геномной ДНК *E. coli* Nissle 1917 и следующих условиях: 95°C – 2 минуты, 30 циклов: 95°C – 15 секунд, 54°C – 30 секунд, 72°C – 40 секунд; досинтез 72°C – 3 минуты, хранение на +4°C. Амплифицированные фрагменты очищали при помощи Monarch Gel Extraction Kit (NEB, Англия) по протоколу производителя. Комплексы формировали в связывающем буфере (50мМ Tris-Cl, 100мМ KCl, 50% глицерин, 1мМ EDTA) при 30°C в течении 30 минут. Непосредственно перед нанесением на гель, не вынимая пробы из термостата, добавляли в каждую из них 3 мкл подогретого до 30°C 50% глицерина и быстро наносили на предварительно прогретый при 240В в 1хTBE буфере (89мМ трис, 89мМ борная кислота, 2мМ

ЭДТА) 5% ПААГ. Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза BioRad (США) при постоянном напряжении 200В в течение 20 минут [19]. Для визуализации результата гель окрашивали бромистым этидием (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиний бромид).

Обсуждение результатов

YihW – основной регулятор экспрессии генов *yih*-кассеты, необходимых клеткам *E. coli* для утилизации сульфоглюкозы в среде с низким содержанием или отсутствием других источников углерода. Исследуемый нами белок находится в пробиотическом штамме Nissle 1917 [11,12]. Изучение биохимических свойств и функциональной активности таких регуляторов способствует более полному пониманию механизмов переключения клетки от одного образа жизни к другому, а также их способности быстро менять источники углерода при попадании в новые условия.

На рисунке 4 представлено сравнение структур YihW из пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 и лаборатор-

ного K-12 MG1655. Различия в аминокислотной последовательности (рис. 1), по-видимому, не влияют на структуру как ДНК-связывающего, так и эффекторного доменов (рис. 4), а аминокислоты, отвечающие за связывание белков с лигандом, являются консервативными (рис. 1 и рис. 4). Это свидетельствует в пользу того, что, вероятнее всего, эти белки имеют похожие регуляторные свойства.

Как и для многих других факторов транскрипции, работа с YihW (CsqR) была осложнена, так как не удавалось получить целевой белок в растворимой фракции. Чаще всего мы даже не видели суперпродукцию белка, и его содержание в контрольных пробах до индукции не отличалось от проб после индукции. Оказалось, что для YihW (CsqR) не работают стандартные методы, которые мы использовали ранее для наработки транскрипционных факторов: добавление индуктора на середине экспоненциальной фазы роста (ОП600~0.3) и, позднее; добавление в векторную конструкцию перед геном его собственной регуляторной области (конструкция **reg**); снижение концентрации IPTG (до 10 мкМ) и другие.

В результате оптимальными условиями индукции белка YihW (CsqR) из штамма *E. coli* Nissle 1917 оказались (рис. 2): штамм BL21(DE3)-CodonPlus-RIL, рост при 37°C, 125 об/мин на воздушной бане, среда LB с ампициллином 200 мкг/мл, добавление индуктора IPTG на отметке ОП600=0.1-0.15 (около 3 часов роста), конечная концентрация IPTG 50мкМ, индукция в течение 5 часов (рис. 2 А). При этом полноразмерный белок YihW (CsqR) (около 29 кДа) накапливается преимущественно в нерастворимой фракции, но в достаточном для дальнейшей очистки количестве с использованием 8М мочевины. Видимых различий при использовании разных конструкций (**reg** и **noreg**) мы не наблюдали. На рис. 2Б можно заметить, что при более продолжительной индукции (20 часов) в клетках накапливается укороченная

форма белка. Это может свидетельствовать о том, что в штамме *E. coli* Nissle 1917 синтезируются две формы белкового продукта гена *yihW* (*csqR*), как это было показано для YihW (CsqR) штамма K-12 [13], что позволяет предположить сходные регуляторные механизмы. Это предположение требует дальнейшего изучения, поскольку в данном случае нельзя исключить процессы протеолиза.

Ещё одной сложностью оказалось то, что стандартный протокол набора Ni-NTA Spin Column (Qiagen) для очистки белков в денатурирующих условиях оказался неприменим к очистке YihW (CsqR). В протоколе производителя очистку белка с использованием в качестве денатуранта 8 М мочевины предлагают осуществлять при помощи промывки колонки буферами с различным pH и высокой концентрацией фосфатного буфера (100мМ NaH₂PO₄) и низкой концентрацией натриевой соли. В нашем случае при использовании такого подхода значительная часть белка не связывалась с колонкой и обнаруживалась в «проскоке». Поэтому нами был разработан оптимизированный протокол очистки YihW с использованием рекомендованных производителем для нативных условий буферов со сниженной до 50мМ концентрацией фосфатов и довольно высокой концентрацией соли Na (300мМ NaCl), но с 8М мочевиной и имидазолом, что не было предусмотрено производителем этих спин-колонок. Используемая нами схема очистки YihW (CsqR) позволяет быстро получить белковый препарат с чистотой около 95% (рис. 3) и в количестве около 56 мг чистого белка из 200 мл культуры клеток.

Интересным наблюдением стало то, что агрегаты, которые формируются в силу повышенной гидрофобности YihW (CsqR) при диализе против буфера с 2М мочевиной, частично растворяются при разбавлении белка в однократном фосфатно-солевом буфере или в связываю

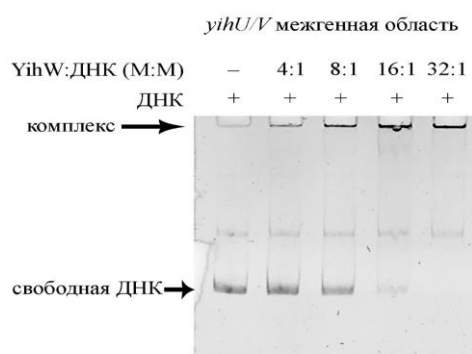


Рис. 5. Оценка эффективности формирования ДНК-белковых комплексов между полученным препаратом YihW и фрагментом ДНК, содержащим межгенную область *yihU/V*. Молярное соотношение указано над дорожками. Связывание YihW (CsqR) с его регуляторной областью *yihU/V* проводили при 30 °С.

Fig. 5. Efficiency of the DNA-protein complex formation between the obtained YihW and the DNA fragment containing *yihU/V* intergenic region. Molar ratios are shown above the tracks.

YihW (CsqR) binding with the *yihU/V* regulatory region was allowed at 30°C.

щем буфере для электрофореза с задержкой в геле (50мМ Tris-Cl, 100мМ KCl, 50% глицерин, 1мМ EDTA) в 2 и в 4 раза (рис. 3, дорожки 14 и 15). Возможно, белки этого семейства могут образовывать октамеры в водных растворах [8], что может объяснять образование растворимых агрегатов. Конечные концентрации белка после разведения составляли 0.28 и 0.16 мг/см³ соответственно. Этого было достаточно для тестов на функциональную активность белка YihW (CsqR) как транскрипционного фактора.

Удивительным образом белок после агрегации в буфере с 2М мочевиной не потерял свою функциональную активность, а дальнейшее разбавление в буфере связывания, по-видимому, приводит к восстановлению его нативной структуры и функциональной активности. Функциональная активность факторов транскрипции оценивается по эффективности их связывания с ДНК-мишенями. Для YihW основной мишенью является область между генами *yihU* (кодирует сульфолactalдегидредуктазу) и *yihV* (кодирует сульфотруктокиназу). Результаты электрофореза с задержкой в геле, приведенные на рис. 5, показывают, что полученный препарат YihW эффективно связывается со своей основной мишенью в геноме штамма Nissle 1917, и при 16-

кратном молярном избытке белка оказывается связанной вся ДНК. Это свидетельствует о высокой активности белка, поскольку в других исследованиях для полного связывания фрагмента ДНК, содержащего эту же регуляторную область, потребовался 200-кратный избыток YihW [6].

Заключение

Таким образом нами была разработана схема экспрессии и очистки белка YihW (CsqR) из *E. coli* Nissle 1917 при помощи специфической сорбции на Ni-NTA спин-колонки в денатурирующих условиях в присутствии 8М мочевины, что значительно ускоряет процесс очистки и позволяет получить однородный и функциональный белковый препарат этого транскрипционного фактора. Активность полученного препарата была подтверждена с помощью электрофореза с задержкой в геле, и он может быть использован в дальнейших экспериментах.

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. Shulami S., Gat O., Sonenshein A. L., Shoham Y. *Journal of bacteriology*. 1999; 181(12): 3695-704. <https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3695-3704.1999>
2. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. *Molecular systems biology*. 2006; 2:2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
3. Cronan J.E. *Molecular microbiology*. 2021; 115(6): 1080-1085. <https://doi.org/10.1111/mmi.14663>
4. Wen Y., Ouyang Z., Devreese B., He W., Shao Y., Lu W., Zheng F. *Protein Science*. 2017; 26: 2073-2082. <https://doi.org/10.1002/pro.3245>
5. Kaznadzey A., Shelyakin P., Belousova E., Eremina A., Shvyreva U., Bykova D., Emelianenko V., Korosteleva A., Tutukina M., Gelfand M.S. *Scientific Reports*. 2018; № 8(1): 3177. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21534-3>
6. Shimada T., Yamamoto K., Nakano M., Watanabe H., Schleheck D., Ishihama A. *Microbiology*. 2019; 165(1): 78-89. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000740>
7. Larson T. J., Ye S., Weissenborn D.L., Hoffmann H.J., Schweizer H. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262(33): 15869-15874. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47669-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47669-7)
8. Mortensen L., Dandanell G., Hammer K. *The EMBO journal*. 1989; 8(1): 325-331. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03380.x>
9. Zeng X., Saxild H.H., Switzer R.L. *Journal of bacteriology*. 2000; 182(7): 1916-22. <https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1916-1922.2000>
10. Garces F., Fernandez F.J., Gomez A.M., Perez-Luque R., Campos E., Prohens R., Aguilar J., Baldoma L., Coll M., Badia J., Cristina Vega M. *Biochemistry*. 2008; 47(44): 11424-11433. <https://doi.org/10.1021/bi800748x>
11. Sonnenborn U., Schulze, J. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009; 21(3-4): 122-158. <https://doi.org/10.3109/08910600903444267>
12. Sonnenborn U. *FEMS Microbiol Lett*. 2016; 363(19): fnw212. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw212>
13. Rybina A.A., Glushak R.A., Bessonova T.A., Dakhnovets A.I., Rudenko A.Y., Ozhiganov R.M., Kaznadzey A.D., Tutukina M.N., Gelfand M.S. *Scientific Report*. 2024; 14(1): 7852. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58492-y>
14. Igarashi K., Ishihama A. *Cell*. 1991; 65(6): 1015-1022. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90553-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90553-b)
15. Bessonova T.A., Lekontseva N.V., Shvyreva U.S., Nikulin A.D., Tutukina M.N., Ozoline O.N. *Protein expression & purification*. 2019; 161: 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.05.001>
16. Potapova, A. V., Ozoline, O. N., Tutukina, M. N. The development of effective overproduction and purification approaches for ExuR transcription factor of *Escherichia coli* using affine chromatography. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protsessy*, 2014; 14(3): 537-539. (In Russ.)
17. Protokol proizvoditelya dlya Ni-NTA Spin Kit (Qiagen). Rezhim dostu-pa: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/protein-purification/tagged-protein-expression-purification-detection/ni-nta-spin-system>. (data obrashheniya: 15.05.2025) (In Russ.)
18. Ozoline O.N., Fujita N., Murakami K., Ishihama A. *European Journal of Biochemistry*. 1998; 253(2): 371-81. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530371.x>
19. Laemmli U.K. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Информация об авторах / Information about the authors

Т.А. Бессонова – к.б.н., научный сотрудник Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия; научный сотрудник Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

А.Е. Колонский – магистрант, факультет почвоведения, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

T.A. Bessonova –PhD, research scientist, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Russian Federation; research scientist, Vavilov Institute for General Genetics RAS, Moscow, Russian Federation, e-mail: tatianabessonova66@gmail.com

A.E. Kolonskii –master's student, Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: alej.kolonsky@gmail.com



Е.С. Трубников – магистрант кафедры микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Д.С. Коршунов – студент биологического факультета, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

А.М. Дукат – аспирант, Федеральная политехническая школа Лозанны, Лозанна, Швейцария

М.С. Гельфанд – д.б.н., профессор, вице-президент по наукам о жизни Сколковского института науки и технологий, Москва, Россия

М.Н. Тутукина – к.б.н., старший научный сотрудник Центра Молекулярной и Клеточной Биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

E.S. Trubnikov – Master's student, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: etrubnikov2002@mail.ru

D.S. Korshunov – student, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: korshunds@yandex.ru

A.M. Dukat – PhD student, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland, e-mail: anna.dukat.m@gmail.com

M.S. Gelfand – Dr. Sci., professor, vice-president, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation, e-mail: mikhail.gelfand@gmail.com

M.N. Tutukina – PhD, senior research scientist, Centre of Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation, e-mail: m.tutukina@skoltech.ru

Статья поступила в редакцию 24.07.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 24.07.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13446

Метод конверсии ДНК бисульфитом натрия с сорбцией на оксид кремния

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

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

Аннотация. В настоящее время исследования метилирования ДНК представляют значительный интерес в фундаментальных и прикладных направлениях, позволяющих раскрыть неизвестные аспекты контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток (в том числе и аномальной), механизмы адаптации, а также разработать способы регуляции работы генома без изменения нуклеотидной последовательности, в том числе и для создания методов лечения различных опухолей, и других аномалий, связанных с нарушением паттерна экспрессии некоторых генов. Цель работы – разработка и оптимизация метода конверсии ДНК бисульфитом натрия для дальнейшего исследования метилирования ДНК в клетках эукариот. Представленный в данной работе метод основан на модификации ДНК за счет дезаминирования неметилированного цитозина с помощью бисульфита натрия. Методика включает четыре ключевых этапа: денатурация ДНК с использованием щелочи, модификация ДНК путем инкубации с раствором бисульфита натрия при повышенных температурах, очистка ДНК, десульфонирование. Очистка ДНК – критический этап, осуществлялся путем сорбции модифицированной ДНК на диоксид кремния. Проведение стадии твёрдофазной экстракции позволило получить модифицированную ДНК без примесей солей бисульфита, что подтверждалось результатами электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Описанный протокол позволяет проводить эффективную модификацию ДНК, полученную из различных тканей, со степенью конверсии ДНК 96-98% с незначительными потерями целевого продукта (33-41%) во время модификации. Данный метод оптимизирует процесс бисульфитной конверсии, предоставляя надежный и экономичный инструмент для анализа паттернов метилирования, с потенциалом к улучшению нашего понимания регуляции экспрессии генов, биологии канцерогенеза и облегчения получения организмов с заданными свойствами.

Ключевые слова: метилирование, ДНК, эпигенетика, модификация, бисульфит натрия, сорбция, электрофорез.

Для цитирования: Анохина Г.Б., Плотникова Е.В., Епринцев А.Т. Метод конверсии ДНК бисульфитом натрия с сорбцией на оксид кремния // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 782-790. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13446>

Original article

Method for DNA conversion using sodium bisulfite with adsorption onto silica matrix

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

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

Abstract. Currently, studies related to DNA methylation are in focus of fundamental and applied research. They allow revealing unknown aspects of controlling cell proliferation and differentiation (including abnormal), understanding adaptation mechanisms, and developing methods for regulating the genome functioning without changing its nucleotide sequence. They also contribute to the development of methods for treating various tumours and other abnormalities associated with the disrupted expression of certain genes. The purpose

of the work is to develop and optimise the method of DNA conversion with sodium bisulphite for further study of DNA methylation in eukaryotic cells. The method presented in this paper is based on DNA modification by deamination of unmethylated cytosine with sodium bisulphite. The procedure consists of four key stages: DNA denaturation with alkali, DNA modification by incubation with sodium bisulphite solution at high temperatures, DNA purification, and desulfonation. DNA purification is a critical stage, which was carried out by sorption of modified DNA on silicon dioxide. The solid-phase extraction made it possible to obtain modified DNA without bisulphite salt impurities, which was confirmed by the results of electrophoresis in 1% agarose gel in the presence of ethidium bromide. The described protocol allows for effective modification of DNA obtained from various tissues with a degree of DNA conversion of 96-98% with insignificant losses of the target product (33-41%) during the modification. This method optimises the process of bisulphite conversion by providing a reliable and cost-effective tool for analysing methylation patterns. It also contributes to a better understanding of the regulation of gene expression and the biology of carcinogenesis. It can also facilitate the production of organisms with desired properties.

Keywords: methylation, DNA, epigenetics, modification, sodium bisulphite, sorption, electrophoresis

For citation: Anokhina G.B., Plotnikova E.V., Eprintsev A.T. Method for DNA conversion using sodium bisulfite with adsorption onto silica matrix. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 782-790. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13446>

Введение

Экспрессия генов – процесс реализации генетической информации организма, регуляция которого осуществляется на нескольких уровнях организации: биохимическом, генетическом и эпигенетическом. Существенные различия в уровне матричной РНК и белков между клетками одного организма, а также их вариации на разных стадиях жизненного цикла нередко наследуются в ряду поколений и обусловлены эпигенетическими механизмами контроля [1]. Колебания в экспрессионной активности генов часто обеспечивают не только фенотипические и функциональные различия в клеточных линиях, но и адаптивные способности организмов к изменяющимся условиям среды, однако, случайные изменения в профиле экспрессии тех или иных генов могут играть не только положительный (например, в качестве способа расширения границ изменчивости и адаптивности), но и отрицательный эффект, способствуя появлению мутаций, сопряженных с инактивацией ферментных систем, играющих важную роль в метаболизме как отдельных клеток, так и всего организма, а также регулирующих клеточный цикл. Работы последних десятилетий позволяют с уверенностью предположить, что эпигенетические механизмы регуляции работы генома играют ключевую роль в

обеспечении контроля экспрессионной гетерогенности [1].

Эпигенетические механизмы контроля работы генома представляют собой наследуемые процессы, обеспечивающие регуляцию активности экспрессии генов, несвязанные с изменением нуклеотидной последовательностью ДНК. Ковалентные модификации ДНК и коровых гистонов являются важными эпигенетическими факторами, обеспечивающими регуляцию экспрессии генов [2-5].

Метилирование ДНК. Метилирование ДНК в своем «классическом» варианте представляет собой ковалентное присоединение метильной группы в 5'-положение цитозинового основания. Данный эпигенетический механизм играет ключевую роль во многих биологических процессах, обеспечивая регуляцию экспрессии генов, тем самым участвуя и обеспечивая эмбриональное развитие, клеточную пролиферацию, дифференциацию и стабильность хромосом [6]. Эпигенетические модификации изменяют паттерны транскрипции в многоклеточных организмах для достижения тканеспецифичной экспрессии генов [7]. Нарушения в паттернах метилирования у человека и млекопитающих сопряжены с расстройством импринга и канцерогенезом [6].

Метилирование цитозина в цепи ДНК осуществляется посредством функциони-

рования специфических ферментных систем - ДНК-метилтрансфераз (ДМТ), которые специфически присоединяют CH_3 -группу к CpG-динуклеотидам, входящим в состав гена, образуя 5-метилцитозин. CpG-динуклеотиды представляют собой располагающиеся рядом цитозин и гуанин, разделенные фосфатом ($5' - \text{C} - \text{phosphate} - \text{G} - 3'$). Метилирование ДНК у млекопитающих осуществляется преимущественно по CpG-сайтам, в то время как у растений встречается в трех контекстах: CpG, CpNpG и CpNpN ($\text{N} = \text{A, T, C}$), которые устанавливаются и поддерживаются уникальным набором ДНК-метилтрансфераз и регулируются специфичными для растений путями [8-10]. Увеличение степени метилирования ДНК в регуляторных областях (например, в области промотора) и телах генов приводит к снижению или полному подавлению экспрессии этих генов, в то время как снижение доли метилированных цитозинов наоборот способствует индукции транскрипционной их активности. Присоединение метильной группы в $5'$ -положение цитозинового кольца в составе молекулы ДНК приводит к смене профиля экспрессии гена в виду, в том числе, изменения пространственной структуры хроматина (увеличение компактизации хроматина препятствует транскрипции гена) [1, 4, 8, 11-13, 15-19]. Кроме того, важно отметить, что метилирование ДНК также играет важную роль в системе защиты генома от инвазивных/чужеродных последовательностей ДНК (например, транспозоны), метилируя и, тем самым, инактивируя их [14].

Метилирование ДНК – распространенный механизм регуляции экспрессии генов у растений [20-22]. За последние десятилетия человечество существенно продвинулось в понимании процессов метилирования, однако, существует огромное количество белых пятен в данной области биологии.

Важная роль метилирования ДНК, как одного из механизмов эпигенетической

регуляции работы генома, создает потребность в эффективных и чувствительных методах анализа метильного статуса отдельных участков ДНК. Бисульфитное геномное секвенирование, разработанное Фроммером и коллегами, было признано революцией в анализе метилирования ДНК [23, 24]. В основе метода лежит конверсия ДНК с использованием бисульфита натрия. Однако, несмотря на достоинства метода бисульфитного секвенирования, на практике этап бисульфитной конверсии является критическим. Успешность его проведения напрямую влияет на дальнейшее исследование. Более того, чаще всего, ошибки или неудачи проведения бисульфитной модификации ДНК приводят к недостоверным результатам или полному их отсутствию. В связи с этим целью работы являлась разработка эффективного, надежного и недорогого метода бисульфитной конверсии ДНК на основании имеющихся в мировой практике методик. В данной статье мы представляем протокол, который в настоящее время часто используется в нашей лаборатории и который дает точные и воспроизводимые результаты.

Экспериментальная часть

Метилирование цитозина является распространенной пост-репликативной модификацией ДНК у млекопитающих и растений. Методы определения участков метилирования ДНК представляют интерес не только в качестве источника фундаментальных знаний основ эпигенетической регуляции, но и с практической точки зрения. Как известно, канцерогенез нередко сопряжен с изменением метильного профиля генов супрессоров опухолей и генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла [25].

Принципиальная основа метода. В настоящее время в качестве одного из способов исследования метильного статуса генома эукариотической клетки применяют бисульфитное секвенирование ДНК. При этом, важным этапом данного

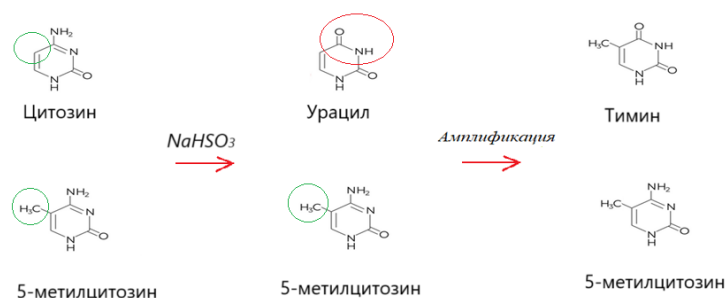


Рис. 1. Схема химической модификации цитозина (метилованного и неметилованного) бисульфитом натрия

Fig. 1. Scheme of chemical modification of cytosine (methylated and non-methylated) with sodium bisulfite

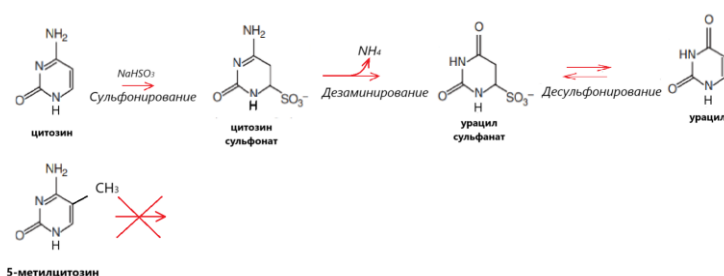


Рис. 2. Схема модификации ДНК бисульфитом натрия с указанием основных этапов

Fig. 2. Scheme of DNA modification with sodium bisulfite, indicating the main steps

исследования является предварительная химическая трансформация ДНК (конверсия) с помощью бисульфита натрия [26]. В основе метода бисульфитной конверсии лежит способность бисульфита натрия приводить к дезаминированию цитозина в составе молекулы ДНК, с дальнейшим химическим десульфонированием его в урацил в присутствии щелочи. При этом, важно отметить, что бисульфит натрия преобразует метилированный цитозин (m5C) гораздо медленнее (рис. 1) [27].

Химическая модификация исследуемой ДНК, способствующая превращению цитозина в урацил с дальнейшей амплификацией в присутствии праймеров для бисульфитного секвенирования, приводит к синтезу молекулы ампликона. В процессе проведения ПЦР урацил распознается ДНК-полимеразой как тимин. Секвенирование клонированного ампликона – бисульфитное геномное секвенирование, позволяет точно обнаружить присутствие m5C в исследуемой области ДНК с разрешением в один нуклеотид

[23, 24]. Существенное преимущество данного метода перед другими заключается в том, что он обеспечивает чтение статуса метилирования каждого отдельного цитозина, что позволяет идентифицировать дифференциально метилированные молекулы ДНК в популяции клеток, а также исследовать динамику изменения метильного статуса интересующих участков генома [28].

Обсуждение результатов

Трансформацию ДНК бисульфитом натрия условно можно разделить на несколько этапов (рис. 2):

1. Денатурация ДНК. Геномная ДНК (до 10 мкг/мл) денатурируется в присутствии щелочи. Высокая концентрация ДНК при бисульфитной конверсии (более 10 мкг/см³) может существенно снизить долю конвертированных молекул, что может быть связано с недостаточным содержанием бисульфита натрия в пересчете на количество молекул ДНК, с увеличением pH среды за счёт образования побочного продукта реакции - NH₄⁺, и как

следствие, снижению способности бисульфита модифицировать ДНК.

2. Модификация ДНК путем инкубации денатурированной ДНК в растворе бисульфита натрия при температуре выше 50°C. Модуляции температуры культивирования, а также проведение нескольких циклов инкубации могут способствовать оптимизации процесса конверсии ДНК, а также снижению/увеличению времени проведения данного этапа. Неполная конверсия ДНК может привести к появлению ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Ренатурация (полная или частичная) ДНК может приводить к существенному снижению конверсии, поэтому целесообразно использовать циклический протокол инкубации ДНК в растворе бисульфита. Кроме того, введение дополнительной стадии обработки образца ДНК протеиназой К позволит избавиться от белков, присутствующих в образце.

3. Очистка ДНК от солей бисульфита. Данная стадия очень важна, так как бисульфит натрия в реакционной среде не только способствует деградации ДНК за счёт сильных окислительных свойств самого бисульфита, но также за счёт способности бисульфита натрия ингибировать работу ДНК-полимераз, ингибирует репликацию ДНК. Наиболее быстрым и эффективным методом очистки ДНК от бисульфита натрия является сорбция молекулы нуклеиновой кислоты на твердом носителе. Использование магнитных частиц в качестве сорбента в составе коммерческих наборов часто осложняется тем, что соли бисульфита сорбируются на магнитные частицы наряду с модифицированной ДНК, тем самым препятствуя дальнейшим исследованиям. Кроме того, нередко, на магнитные частицы сорбируются в большей степени короткие фрагменты модифицированной ДНК, что в дальнейшем, может привести к появлению ложно положительных и ложноотрицательных результатов.

4. Десульфонирование сульфонилационных аддуктов осуществляется также в присутствии щелочи.

Несмотря на то, что в настоящее время существует множество различных наборов для бисульфитной конверсии ДНК они не всегда эффективны, дают достаточно низкий выход модифицированной ДНК и очень дорогостоящи. Исследование большого количества образцов в этом случае может быть очень накладным. Проведение бисульфитной конверсии ДНК «вручную» позволяет не только эффективно и недорого осуществить этот этап исследования, но и адаптировать его к конкретным объектам, целям и условиям работы. Ниже мы предлагаем используемый нами протокол бисульфитной конверсии ДНК, который показал высокую эффективность и низкую себестоимость, в сравнении с использованием коммерческих наборов.

Оценка качества полученного препарата. Для оценки пригодности полученной модифицированной ДНК для дальнейших исследований удобно использовать метод электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле. Для визуализации нуклеиновой кислоты при приготовлении в гель добавляется бромистый этидий. Важно отметить, что модифицированная ДНК на электрофореграмме будет иметь меньший размер в сравнении с немодифицированной ДНК. Присутствие в полученном препарате солей бисульфита и спиртов приведет к невозможности визуализации ДНК. Более того, присутствие бисульфита вызывает появление на электрофореграмме в УФ-свете зелено-голубого пятна.

Материалы. 3М водный раствор NaOH (ГОСТ 4328-77, хч, Россия) (свежеприготовленный). 200 мМ гидрохинон (свежеприготовленный). Для этого растворяли 0.022 г гидрохинона (Sigma Aldrich, США) в 1 см³ дистиллированной воды, очищенной от нуклеаз. 6.9 М раствор бисульфита натрия (pH 5.0-5.3). Раствор би-

сульфита натрия готовили непосредственно перед работой. Бисульфит натрия (Sigma Aldrich, США) растворяли в небольшом объеме дистиллированной воды, очищенной от нуклеаз, после чего проверяли pH раствора. При необходимости значения pH доводили до 5.0-5.3 с помощью 3 М NaOH. На 40 проб достаточно было 1 см³ раствора гидрохинона и 12 мл раствора бисульфита натрия. Растворы не хранятся, их необходимо готовить непосредственно перед проведением модификации ДНК. Протеиназа К (Евроген, Россия). Обработка протеиназой К осуществлялась в соответствии с рекомендациями производителя. Дистиллированная вода, очищенная от нуклеаз (dH₂O) 80 и 96% этанол. 10 М ацетат аммония или 3М ацетат натрия (HiMedia Laboratories, Индия). Использование и той, и другой соли равновероятно и не приводило к снижению эффективности, однако, следует учесть, что соли аммония и соли натрия необходимы в качестве осадителя ДНК. Предпочтительно использовать ацетат аммония, так как соли аммония не ингибируют ПЦР, в то время как ацетат натрия ингибирует активность ДНК-полимеразы, препятствуя амплификации в том случае, если отмывка от солей была осуществлена небрежно, то есть не в полной мере. Гликоген (3 мг/см³) (Thermo scientific, Thermo FC, США), выступал в качестве со-осадителя ДНК. Сорбент на основе диоксида кремния. Магнитные сорбенты, к сожалению, не пригодны для отмывки ДНК от солей бисульфита. В качестве сорбента можно применять коммерческие наборы, однако мы предлагаем использовать самостоятельно приготовленный сорбент как описано нами [29].

Этап 1. Денатурация. К 2 мкг ДНК или 1 нг очищенного фрагмента добавляли 5.5 мкл свежеприготовленного 3М NaOH, после чего доводили dH₂O до 50 мкл. Использование слишком большого количества ДНК может привести к неполному дезаминированию. Инкубировали 30 ми-

нут при 37 °С. Пока шла инкубация готовили растворы бисульфита натрия и гидрохинона, после чего готовили модифицирующий раствор. Смесь необходимо использовать сразу после наведения, так как она не подлежит хранению. Далее приведен пример приготовления модифицирующего раствора на 10 проб.

Модифицирующий раствор. К 250 мкл 200 мМ раствора гидрохинона добавляли 3 мл раствора бисульфита натрия. Проверляли, чтобы pH раствора составлял 5.0-5.3. Доводили модифицирующую смесь до 10 мл. К 50 мкл денатурированной ДНК добавляли 30 единиц Протеиназы К (Евроген, Россия) и следовали протоколу производителя - инкубировали сначала 10 минут при 55°C, после 5 минут при 65°C.

Этап 2. Модификация ДНК. Добавляли к пробам, обработанным протеиназой К, 450 мкл модифицирующего раствора. Инкубировали образцы в амплификаторе Biometra Personal cycler (Biometra, Германия) согласно следующему протоколу:

15 циклов { 94° С – 3 минуты;
55° С – 15 минут;

Инкубировали образцы при 4 ° С в течение 5 минут. После проведения этой стадии можно прерваться и заморозить образцы на срок до 48 часов.

Этап 3. Очистка модифицированной ДНК от бисульфита натрия путем сорбции на мелкодисперсном диоксиде кремния (SiO₂). К модифицированной ДНК, полученной на предыдущем этапе, добавляли 100 мкл мелкодисперсного диоксида кремния, приготовленного по методике, как описано в [29] и тщательно и осторожно перемешивали образцы в течение 3-5 минут. На этой стадии происходило непосредственная сорбция ДНК на кремниевый носитель. Чем больше размер частиц, тем больше молекул ДНК связывалось с сорбентом. Важно было избежать тряски пробирок, которая могла привести к повреждениям молекулы ДНК. Добавляли 2.5 объема 80% этанола (≈ 1.3 см³) и тщательно перемешивали.

Центрифугировали 5000 g в течение 5-7 минут при комнатной температуре. Надосадок удаляли, а осадок промывали 800 мкл 80% этанола. Высушивали с открытой крышкой в течение 5 минут до исчезновения запаха этанола. Модифицированную ДНК десорбировали путем добавления 300 мкл воды, свободной от ДНКаз и переносили надосадок в новую пробирку.

Этап 4. Десульфонирование. К раствору добавляли 33 мкл 3М NaOH. Тщательно перемешивали. Смесь инкубировали 20 минут при 37°C в твердотельном термостате (ДНК-технология, Россия). Добавляли 6 мкл гликогена и 105 мкл 10М ацетата аммония (pH 5.6) (или 33 мкл 3М ацетата натрия (pH 5.4)). После чего к раствору приливали 1350 мкл 80% этанола (примерно 3 объема). Перемешивали, переворачивая пробирку в течение 1 минуты, и инкубировали при -20°C не менее 20 минут. Обычно для осаждения ДНК 20-30 минут при -20 °C вполне достаточно, но можно продлить эту стадию на срок до 2 и более часов. Центрифугировали на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия) 30 минут при 13000 g при комнатной температуре. Надосадок удаляли, а осадок дважды промывали 80% этанолом. Высушивали 5-7 минут с открытой крышкой. Растворяли осажденную и промытую ДНК в 20-50 мкл воды или ТЕ-буфера.

В случае, если в пробирке на стадии 18 наблюдали большое количество белого осадка, доделывали до стадии 21 и переходили к 3 этапу, еще раз проводили сорбцию модифицированной ДНК на оксид кремния. Присутствие в образцах солей бисульфита и его производных способно препятствовать визуализации модифицированной ДНК с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и ингибировать ПЦР [30, 31].

Трансформация ДНК бисульфитом натрия изменяет физико-химические свойства двуцепочечной молекулы ДНК.

ДНК из большой стабильной двухцепочечной молекулы конвертируется в набор одноцепочечных фрагментов, в которых все неметилированные цитозины полностью заменены на урацил.

Концентрацию модифицированной ДНК определяли спектрофотометрически спектрофотометрически на приборе Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) в 0.09%, при длине волны 260 нм: 1.0= 40 мкг/мл.

Электрофорез модифицированной в 1% агарозном геле. Качественный анализ модифицированной ДНК осуществляли путём проведения электрофореза в 1% агарозном геле (Helicon, Россия) с добавлением бромистого этидия (Sigma Aldrich, США) в камере для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия) с использованием в качестве источника тока прибора Эльф- 4 (ДНК-технология, Россия). В качестве буферной системы использовали 1X TAE-буфер (pH 8.0). В одну лунку геля вносили порядка 100 нг модифицированной ДНК, смешанной с загрузочным буфером Gel Loading Dye, Blue (Евроген, Россия).

Для визуализации полос ДНК на электрофореграмме использовали трансллюминатор Serva Blue cube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) с длиной волны 312 нм. На рисунке 3Б показана типичная электрофореграмма модифицированной по представленной методике ДНК в 1% агарозном геле.

Часто, после электрофореза в геле не визуализируется модифицированная ДНК, что связано с тем, что молекула почти полностью становится одноцепочечной и существенно деградирует. Охлаждение геля в течение 5-10 минут на ледяной бане способствовало спариванию оснований для возможного взаимодействия с бромистым этидием. Модифицированная ДНК на геле в этом случае выглядит как шмеры порядка 400-1800 п.н.

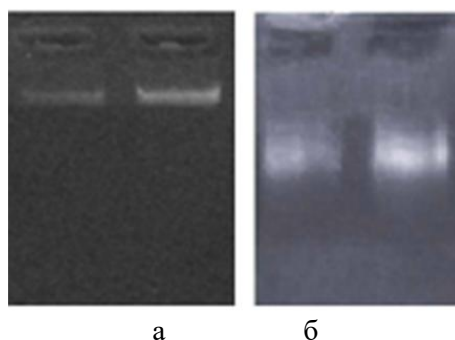


Рис. 3. Электрофорез ДНК в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия: а – электрофорез ДНК до модификации бисульфитом натрия; б – электрофорез ДНК, подвергнутой модификации бисульфитом натрия.

Fig. 3. Electrophoresis of DNA in 1% agarose gel in the presence of ethidium bromide: (a) electrophoresis of DNA before modification with sodium bisulfite; (b) electrophoresis of DNA modified with sodium bisulfite.

(рис.3Б). Появление на электрофореграмме зеленых пятен указывает на присутствие в образцах ДНК солей бисульфита и его производных, приводящих к невозможности связывания бромистого этидия с модифицированной ДНК, а также проведения ПЦР.

Заключение

Таким образом, представленная в работе методика позволяет провести модификацию ДНК, полученную из эукариотических клеток. Преимуществом данного метода является его относительная простота, которая не требует специального дорогостоящего оборудования и реактивов. Конверсия ДНК, по методике, представленной в статье, позволяет получить ДНК со степенью конверсии порядка 96-98%. Потери ДНК в ходе модификации составляют порядка 33-41%, что в целом для данного метода является хо-

рошим результатом. Важным этапом данного метода является сорбция модифицированной ДНК на мелкодисперсный оксид кремния, что позволяет избежать загрязнения целевого продукта солями бисульфита, которые могут препятствовать дальнейшим исследованиям. Проведение рутинного электрофореза ДНК в 1% агарозном геле позволяет качественно оценить чистоту полученного препарата от модифицирующего агента. Более того, невысокая себестоимость используемых реактивов позволяет конвертировать ДНК в значительных объемах, анализируя в дальнейшем большое количество образцов.

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. Semenova E.V., Varfolomeeva E.Ju., Filatov M.V. *Citologija*, 2020; 62(2):79-97.
2. Semenova E.V., Filatov M.V. *Citologija*, 2013; 55(5): 290.
3. Battich N., Stoeger T., Pelkmans L. *Cell*, 2015; 163: 1596.
4. Stoeger T., Battich N., Pelkmans L. *Cell*, 2016; 164: 1151.
5. Panzeri I., Pospisilik J.A. *Molecular metabolism*, 2018; 14: 26.

6. Krueger F., Kreck B., Franke A. *Nature methods*, 2012; 9: 145-151. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1828>
7. Amedeo P., Habu Y., Afsar K., Scheid O.M., Paszkowski J. *Nature*, 2000; 405: 203-206.
8. Leichter S.M., Du J., Zhong X. *Springer International Publishin*, 2022; 1389: 137-157. https://doi.org/10.1007/978-3-031-11454-0_6
9. Bird A.P., *Nucleic Acids Res*, 1980; 8: 1499-1504.
10. Coulondre C., Miller J.H., Farabaugh, P.J., Gilbert, W., *Nature*, 1978; 274: 775-780.

11. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21: 7457.
12. Bird A.P., Wolffe A.P. *Cell*, 1999; 99: 451-454.
13. Colot V., Rossignol J. L., *Bioessays*, 1999; 21: 402-411.
14. Hafiz I.A., Anjum M.A., Grewal A.G., Chaudhary G.A. *Acta physiologiae plantarum*, 2001; 23: 491-499.
15. Du J., Johnson L. M., Groth M., Feng S., Hale C. J., Li S., Jacobsen S. E. *Molecular cell*, 2014; 55: 495-504.
16. Du J., Johnson L.M., Jacobsen S.E., Patel D.J. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2015; 16: 519-532. <https://doi.org/10.1038/nrm4043>
17. Papareddy R. K., Paldi K., Smolka A. D., Hütther P., Becker C., Nodine M. D. *elife*, 2021; 10: 69396.
18. Lindroth A.M., Cao X., Jackson J.P., Zilberman D., McCallum C.M., Henikoff S. *Science*, 2001; 292: 2077-2080. <https://doi.org/10.1126/science.1059745>
19. Zhong X., Hale C.J., Nguyen M., Ausin I., Groth M., Hetzel J. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015; 112: 911-916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423603112>
20. Eprincev A.T., Fedorin D.N., Anokhina G.B., Gataullina M.O., *Fiziologija rastenij*, 2021; 68(2): 187-193. (In Russ.)
21. Eprintsev A.T., Anokhina G.B., Shakhov Z.N., Moskvina P.P., Igamberdiev, A.U. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024; 25: 12711.
22. Eprintsev A.T., Anokhina, G.B., Selivanova, P.S., Moskvina, P.P., Igamberdiev, A.U. *Plants*, 2024; 13: 2651.
23. Frommer M., McDonald L.E., Millar D. S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Paul C.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992; 89: 1827-1831.
24. Susan J. C., Harrison J., Paul C. L., Frommer, M. *Nucleic acids research*, 1994; 22: 2990-2997.
25. Qiu G. H., Salto-Tellez M., Ross J.A., Yeo W., Cui Y., Wheelhouse N., Hooi, S. C. *Journal of hepatology*, 2008; 48: 433-441.
26. Smirnihina S.A., Lavrov A.V., *Molekuljarnaja biologija*, 2009; 43(3): 387-391. (In Russ.)
27. Jackson J.P., Lindroth A.M., Cao X., Jacobsen S.E. *Nature*, 2002; 416: 556-560. <https://doi.org/10.1038/nature731>
28. Darst R. P., Pardo C. E., Ai L., Brown K. D., Kladde M. P. *Current protocols in molecular biology*, 2010; 91: 7-9.
29. Anokhina, G.B., Selivanov, A.Y., Gryazev, A.S., Eprintsev, A.T., Chukhlebova, O.E. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssessy*, 2023; 23(2), 290-298. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11152>
30. Selemenov V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A. *Fosfolipidy na fone prirodnyh matric*. Voronezh, Nauchnaja kniga, 2020, 318 p. (In Russ.)
31. Selemenov V. F., Rudakov O. B., Slavinskaja G.V., Drozdova N.V. *Pigmenty pishhevyh proizvodstv (Melanoidiny)*. Moskva, DeLi print, 2008, 246 p. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Г.Б. Анохина – старший преподаватель кафедры биохимии и физиологии клетки, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, e-mail: dowi2009@mail.ru

Е.В. Плотникова – магистр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, 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, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

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

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

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

Статья поступила в редакцию 05.06.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 05.06.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 57.088.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13447

Сравнение сорбционных методов выделения тотальной ДНК из мышечной ткани: влияние на выход и целостность митохондриальной ДНК

Ирина Сергеевна Садовникова¹, Полина Ивановна Бабенкова¹,
Инна Юрьевна Буракова², Михаил Юрьевич Сыромятников²,
Артем Петрович Гуреев^{1✉}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, gureev@bio.vsu.ru✉

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Аннотация. Нейромышечные заболевания, связанные с генетическими и митохондриальными нарушениями, требуют высококачественного выделения ДНК из мышечной ткани для последующего молекулярно-генетического анализа. В данной работе проведена сравнительная оценка методов экстракции тотальной ДНК из скелетных мышц мыши, включая преципитацию, сорбцию на силикатных мембранах, сыпучих сорбентах и магнитных частицах. Результаты показали, что, несмотря на наибольший выход тотальной ДНК при преципитации, доля митохондриальной ДНК (мтДНК) в этих образцах минимальна из-за неселективного осаждения деградированных фрагментов ядерной ДНК. Напротив, методы сорбции на колонках и магнитных частицах обеспечивают значительно более высокое содержание мтДНК (в 4,5 раза выше) и лучшую сохранность митохондриального генома. При этом сыпучие сорбенты продемонстрировали наибольший уровень повреждений мтДНК, что связано, по всей видимости, с механической фрагментацией и неоптимальной элюцией. Для оценки целостности мтДНК наиболее эффективной оказалась количественная ПЦР в реальном времени с SYBR Green, которая, в отличие от качественных методов, позволяет точно детектировать даже незначительные повреждения. Важно отметить, что SYBR Green не оказывал ингибирующего эффекта на амплификацию фрагментов длиной ~2 т.п.н., что подтверждает применимость этого подхода для анализа мтДНК. Наибольшая уязвимость к повреждениям наблюдалась в D-петле мтДНК — ключевом регуляторном участке, что особенно важно при изучении митохондриальной дисфункции в мышечной ткани. Таким образом, для исследований мтДНК оптимальны методы сорбции на колонках или магнитных частицах в сочетании с количественной ПЦР, обеспечивающие высокую чувствительность и достоверность результатов.

Ключевые слова: Выделение ДНК, сорбенты, диоксид кремния, магнитные частицы, митохондриальная ДНК, мышечная ткань

Благодарности: работа поддержана Министерством науки и высшего образования в рамках нацпроекта «Наука и университеты» (проект FZGW-2024-0003).

Для цитирования: Садовникова И.С., Бабенкова П.И., Буракова И.Ю., Сыромятников М.Ю., Гуреев А.П. Сравнение сорбционных методов выделения тотальной ДНК из мышечной ткани: влияние на выход и целостность митохондриальной ДНК // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 791-799. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13447>

Original article

Comparison of sorption methods for total DNA isolation from muscle tissue: influence on the yield and integrity of mitochondrial DNA

Irina S. Sadovnikova¹, Polina I. Babenkova¹, Inna Yu. Burakova²,
Mikhail Yu. Syromyatnikov², Artem P. Gureev^{1✉}

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, gureev@bio.vsu.ru✉

Abstract. Neuromuscular diseases associated with genetic and mitochondrial impairments require high-quality DNA extraction from muscle tissue for subsequent molecular genetic analysis. This study presents a comparative evaluation of total DNA extraction methods from mouse skeletal muscle, including precipitation, silica membrane adsorption, bulk sorbents, and magnetic particles. The results demonstrated that although precipitation yielded the highest total DNA amount, the proportion of mitochondrial DNA (mtDNA) in these samples was minimal due to non-selective co-precipitation of degraded nuclear DNA fragments. In contrast, column-based adsorption and magnetic particle methods provided significantly higher mtDNA content (4.5-fold increase) and better preservation of mitochondrial genome integrity. Bulk sorbents showed the highest level of mtDNA damage, likely due to mechanical fragmentation and suboptimal elution conditions. Quantitative real-time PCR with SYBR Green proved to be the most effective method for assessing mtDNA integrity, enabling precise detection of even minor lesions, unlike qualitative approaches. Notably, SYBR Green did not inhibit amplification of ~2 kbp fragments, confirming its suitability for mtDNA analysis. The highest vulnerability to damage was observed in the mtDNA D-loop region, a key regulatory site, which is particularly relevant for studying mitochondrial dysfunction in muscle tissue. Thus, column-based or magnetic particle sorption methods combined with quantitative PCR are optimal for mtDNA studies, ensuring high sensitivity and reliability of results.

Keywords: DNA extraction, sorbents, silicon dioxide, magnetic particles, mitochondrial DNA, fragmentation, muscle tissue

Acknowledgments: the work was supported by the Ministry of Science and Higher Education within the framework of the national project "Science and Universities" (project FZGW-2024-0003).

For citation: Sadovnikova I.S., Babenkova P.I., Burakova I.Yu., Syromyatnikov M.Yu., Gureev A.P. Comparison of sorption methods for total DNA isolation from muscle tissue: influence on the yield and integrity of mitochondrial DNA. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 791-799. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13447>

Введение

Нейромышечные заболевания представляют собой серьезную медико-биологическую проблему, обусловленную генетическими мутациями, митохондриальными дисфункциями или нарушениями в регуляции мышечного метаболизма [1]. Изучение этих патологий требует адекватных экспериментальных моделей, среди которых особое место занимают животные, позволяющие воспроизводить ключевые аспекты заболеваний человека [2]. Однако успешное моделирование невозможно без детального молекулярно-генетического анализа, включающего выделение и исследование нуклеиновых кислот из мышечной ткани. В отличие от других биологических образцов, скелетные мышцы представляют собой сложный объект для экстракции ДНК из-за высокого содержания соединительной ткани, липидов и протеаз, способных деградировать нуклеиновые кислоты. Особую сложность представляет выделение

митохондриальной ДНК (мтДНК), которая в силу своей структурной организации, отсутствия гистонов, более подвержена повреждениям, в том числе и в процессе экстракции [3]. Еще в 1998 году Helbock и коллеги обратили внимание на то, что фенольная экстракция ДНК приводила к значительному накоплению окисленных оснований гуанина, в то время как добавления хаотропного агента йодида натрия способствовало снижению повреждений ДНК на порядок [4].

Однако еще в 1979 году было открыта высокая аффинность ДНК с силикатами. Благодаря прочной связи ДНК с кремниевой матрицей, оставшиеся клеточные примеси могут быть вымыты до элюирования извлеченной ДНК с частиц кремния дистиллированной водой или буферами [5]. В 1998 году Хокинс подал патент под названием «Очистка и выделение ДНК с использованием магнитных частиц» [6]. Для экстракции используют магнитные наночастицы, покрытые ДНК-связывающим полимером. Магнитные частицы обычно состоят из магнетита

или маггемита в сердцевине, а поверхностные вещества также могут иметь силикатную природу. Отделение связанных с ДНК магнитных частиц от клеточного лизата достигается путем приложения магнитного поля ко дну пробирки с помощью внешнего магнита. После того как частицы агрегируют на дне пробирки с помощью центрифугирования, супернатант смывается [5]. Предполагается, что данные методы являются более щадящими по сравнению с классическими методами фенольной экстракции ДНК, однако количественную оценку целостности митохондриального генома после выделения ДНК из скелетных мышц с использованием различных подходов ранее не проводили.

Целью данной работы стала сравнительная оценка различных методов выделения ДНК из мышечной ткани, включая традиционную преципитацию, сорбцию на частицах диоксида кремния, а также на силикатных мембранах и использование магнитных частиц. Основное внимание уделялось таким параметрам, как выход тотальной и митохондриальной ДНК, оценка степени ее фрагментации, которая напрямую влияет на возможность использования экстрагированной ДНК для последующих молекулярно-генетических исследований.

Экспериментальная часть

Для выделения тотальной ДНК использовали замороженные образцы четырехглавой мышцы бедра (*musculus quadriceps femoris*) самца мыши. Во всех случаях использовали фрагмент мышечной ткани массой 0.2 мг. Для сравнения были взяты 5 наборов для экстракции нуклеиновых кислот. Все центрифугирования, описанные ниже, проводились при комнатной температуре на центрифуге Eppendorf 5424R при 13 000 g.

1. Метод «Проба ГС» (ДНК-технология). К 150 мкл лизирующего раствора добавляли 20 мкл сорбента и 50 мкл

пробы. Смесь прогревали при 50 °С в течение 20 минут, после чего центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость. К осадку сорбента последовательно добавляли по 200 мкл промывочных растворов (№1, №2 и №3), проводя после каждого добавления вортиксирование и центрифугирование. Далее пробирки с открытыми крышками просушивали, добавляли 100 мкл элюирующего раствора и прогревали 5 минут при 50 °С. После заключительного центрифугирования в течение 1 минуты полученный препарат ДНК был готов к амплификации.

2. Метод «МагноПрайм-ФАСТ» (АмплиПрайм). К 200 мкл лизирующего раствора добавляли 10 мкл магнитного силикатного сорбента (МГС) и 100 мкл пробы. Смесь инкубировали при 60°С в течение 10 минут, центрифугировали и удаляли супернатант. К осадку, не перемешивая, добавляли 500 мкл Буфера Е, центрифугировали и снова удаляли надосадочную жидкость. Затем сразу добавляли 100 мкл Буфера Е и термостатировали пробирки в течение 5 минут. После центрифугирования (1 мин) препарат ДНК был готов к амплификации.

3. Метод «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс). К 300 мкл лизирующего раствора добавляли 100 мкл пробы и прогревали смесь при 65°С. Затем вносили 25 мкл универсального сорбента, вортиксировали и центрифугировали 1 минуту. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 300 мкл промывочного раствора №1, центрифугировали и отбирали супернатант. Далее добавляли 500 мкл промывочного раствора №2, вортиксировали и центрифугировали. Эту промывку раствором №2 повторяли дважды. После этого пробирки с открытыми крышками выдерживали в термостате для просушки в течение 5 минут, добавляли 50 мкл ТЕ-буфера и прогревали еще 5 минут. После финального центрифугирования препарат ДНК был готов к амплификации.

4. Метод «РИБО-преп» (АмплиСенс). К 300 мкл лизирующего раствора добавляли 100 мкл пробы и инкубировали при 65 °С в течение 5 минут. Затем добавляли 400 мкл раствора для преципитации и центрифугировали 5 минут. Образовавшийся белый осадок на дне пробирки не тревожили, надосадочную жидкость удаляли и добавляли 500 мкл промывочного раствора №2. Содержимое перемешивали путем многократного переворачивания пробирки, центрифугировали и удаляли супернатант. К осадку добавляли 200 мкл промывочного раствора №3 и повторяли центрифугирование. После удаления супернатанта осадок просушивали в термостате, добавляли 50 мкл РНК-буфера и прогревали еще 5 минут. После центрифугирования препарат был готов к амплификации.

5. Метод с использованием набора для выделения ДНК на спин-колонках. К 200 мкл Буфера LB добавляли 100 мкл пробы, 2 мкл протеиназы К и 5 мкл β-меркаптоэтанол. Смесь инкубировали 20 минут при 56 °С. Затем добавляли 280 мкл раствора для сорбции и перемешивали. На спин-колонку наносили 650 мкл полученного лизата и центрифугировали. Фильтрат удаляли, в колонку вносили 300 мкл Буфера WB1 и снова центрифугировали. Этот шаг промывки повторяли. Затем в колонку вносили 500 мкл раствора для промывки 2, центрифугировали и удаляли фильтрат. Промывку раствором 2 проводили дважды. Спин-колонку помещали в новую пробирку, наносили на центр мембраны 50 мкл элюирующего буфера и инкубировали в термостате. После этого пробирку с колонкой центрифугировали в течение 1 минуты. Полученный препарат ДНК был готов к амплификации.

После выделения ДНК проводился качественный анализ с помощью электрофорез в 2% агарозном геле с 1х ТАЕ буфером. Количественный анализ нуклеиновых кислот осуществляли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США)

с соответствующими коммерческими наборами.

Оценка степени повреждения митохондриальной ДНК проводилась с помощью оригинальной методики длинноцепочечной ПЦР, разработанной для количественного анализа структурных нарушений в мтДНК мышей [7]. В основе метода лежит принцип зависимости эффективности амплификации от количества повреждений в ДНК. Для проведения анализа использовали амплификатор CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, США) а также два разных набора для проведения ПЦР 5X qPCRmix-HS и 5X qPCRmix-HS SYBR (оба Евроген, Россия).

Оптимизированный протокол ПЦР состоял из следующих этапов: начальная денатурация при 95°С в течение 3 минут, затем 35 циклов, каждый из которых включал денатурацию (95°С, 10 секунд), отжиг праймеров (59°С, 4 минуты 30 секунд) и элонгацию (72°С, 30 секунд).

Обсуждение результатов

Наибольший выход тотальной ДНК (16 нг/мкл) наблюдался в пробах, выделенных методом преципитации с использованием набора РИБО-преп. При выделении ДНК с использованием сорбентов и магнитных частиц концентрация ДНК была примерно в три раза ниже в диапазоне от 5.09 до 6.81 нг/мкл (рис. 1а). Однако несмотря на трехкратное превосходство по общему выходу ДНК при использовании методов преципитации, доля мтДНК в этих образцах оказывается минимальной. Напротив, при выделении с помощью сорбционных колонок наблюдается максимальное содержание мтДНК (примерно в 4.5 раза выше по сравнению с преципитацией) (рис. 1б). Вероятно, это может объясняться неселективной природой осаждения, при котором в препарат попадают все растворимые нуклеиновые компоненты, включая многочисленные деградировавшие фрагменты ядерной

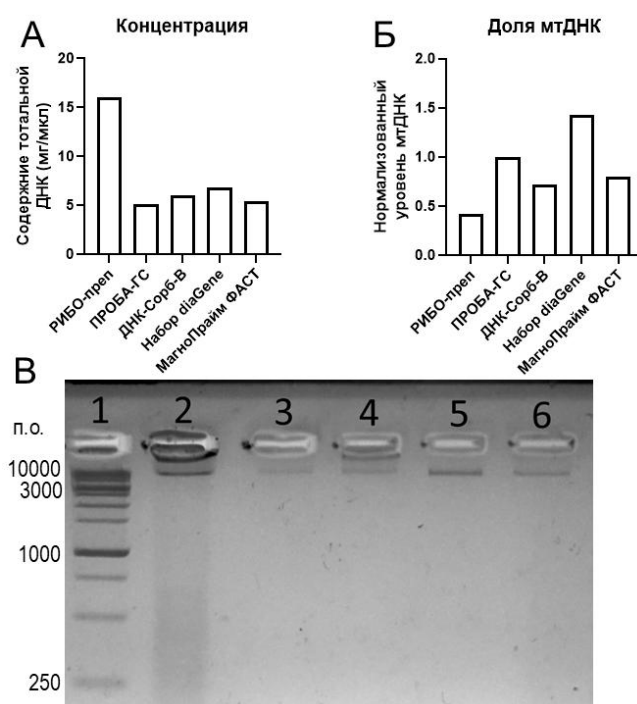


Рис.1. Влияние различных методов выделения общей ДНК из скелетных мышц мышей на содержание общей ДНК (А), долю мтДНК относительно общей ДНК (Б). Электрофореграмма общей ДНК, выделенной из скелетных мышц мышей (В). 1 – маркеры длины ДНК, 2 – ДНК выделенная набором РИБО-преп, 3 – ДНК выделенная набором ПРОБА-ГС, 4 – ДНК выделенная набором ДНК-Сорб-В, 5 – ДНК выделенная набором diaGene, 6 – ДНК выделенная набором МагноПрайм ФАСТ.

Fig. 1. The effect of various methods of extracting total DNA from skeletal muscles of mice on the content of total DNA (A), the proportion of mtDNA relative to total DNA (B). Electrophoresis of total DNA isolated from skeletal muscles of mice (C). 1 – DNA length markers, 2 – DNA isolated using RIBOSEprep, 3 – DNA isolated with a set of PROBA-GS, 4 – DNA isolated with a set of DNA-Sorb-B, 5 – DNA isolated with a set of diaGene, 6 – DNA isolated with a set of MagnoPrime FAST.

ДНК, которые на электрофореze выглядят в виде шмеров, тогда как при выделении ДНК с использованием сорбентов или магнитных частиц, такие шмеры отсутствуют (рис. 1В). Эти данные отражают фундаментальные различия в механизмах выделения: неспецифическая агрегация при преципитации и направленная сорбция на функционализированных поверхностях, что имеет критическое значение для исследований, требующих анализа митохондриального генома.

Метод длинноцепочечной ПЦР представляет собой высокочувствительный подход для детекции повреждений мтДНК, обладающий значительным потенциалом для применения в различных

областях, включая биомедицинские исследования и биоэкологический мониторинг [8]. Его особая ценность заключается в способности выявлять широкий спектр повреждений – от однонитевых разрывов до объемных химических модификаций, что делает его незаменимым инструментом при изучении патогенеза нейродегенеративных заболеваний [9], процессов старения [10] и воздействия экотоксикантов [11]. Однако, несмотря на активное использование данной методики при исследовании таких тканей как мозг и печень, скелетные мышцы остаются недостаточно изученными в этом аспекте, что создает существенный пробел в понимании митохондриальной дисфункции при мышечных патологиях.

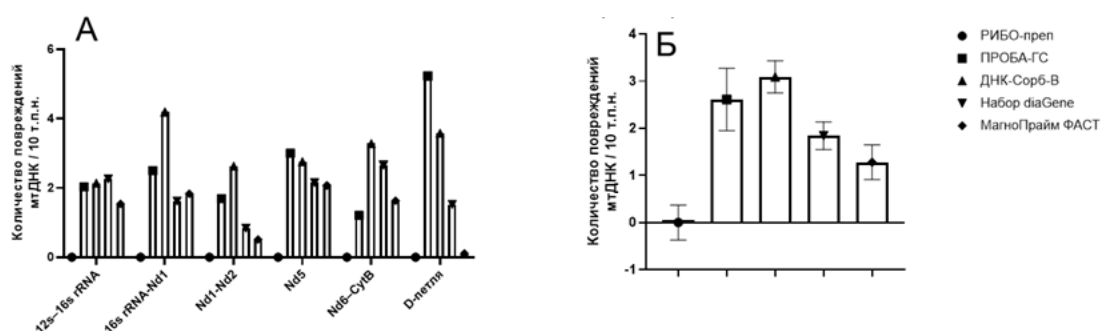


Рис. 2. Влияние набора для выделения ДНК на количество повреждений мтДНК в каждом из шести амплифицированных фрагментах (А), на среднее количество повреждений во всей мтДНК (Б).

Fig. 2. The effect of the DNA extraction kit on the number of mtDNA damages in each of the six amplified fragments (A), on the average number of damages in the entire mtDNA (B).

В рамках данного исследования была проведена сравнительная оценка влияния различных методов выделения ДНК на степень повреждения митохондриального генома в мышечной ткани. Полученные результаты демонстрируют, что минимальный уровень повреждений (0 ± 0.15 повреждений / 10 т.п.н.) наблюдается при использовании методов преципитации (рис. 2а), что может быть объяснено отсутствием этапа сорбции, который, как показано было ранее, потенциально может оказывать воздействие на структуру двойной спирали [12]. При этом методы, основанные на использовании магнитных частиц и сорбции на колонках, также показали удовлетворительные результаты по сохранности мтДНК. Количество повреждений составляло 1.28 ± 0.15 и 1.84 ± 0.12 повреждений на 10 т.п.н., соответственно. Напротив, коммерческие наборы, предполагающие добавление сорбента непосредственно в пробирку, продемонстрировали наибольший уровень повреждений – 2.61 ± 0.27 повреждений на 10 т.п.н. при выделении набором ПРОБА-ГС и 3.10 ± 0.14 повреждений на 10 т.п.н., при выделении набором ДНК-Сорб В (рис. 2б). Различия в эффективности методов могут быть обусловлены несколькими факторами. Во-первых, механическое воздействие при перемешивании образцов с сыпучими сорбентами мо-

жет приводить к фрагментации кольцевых молекул мтДНК. Во-вторых, вариабельность в эффективности сорбции и элюции при использовании таких наборов может способствовать селективной потере интактных молекул. Кремнеземные сорбенты обладают уникальными поверхностными свойствами, обусловленными наличием силанольных групп (Si-OH), которые способны к образованию водородных связей с фосфатными остатками остова ДНК. В присутствии хаотропных солей (таких как гуанидин-тиоцианат) происходит дегидратация как поверхности кремнезема, так и молекул ДНК, что усиливает электростатические взаимодействия между отрицательно заряженными фосфатными группами нуклеиновых кислот и частично депротонированными силанольными группами (Si-O⁻). Катионы (Na⁺, K⁺) в буферных растворах выступают в роли «ионных мостиков», нейтрализуя заряды и стабилизируя адсорбционный комплекс. Одновременно гидрофобные взаимодействия между азотистыми основаниями ДНК и неполярными участками модифицированной поверхности кремнезема способствуют дополнительной стабилизации сорбционного комплекса [13]. Так же стоит учитывать, что состав буферных систем в разных наборах может неоптимально влиять на стабильность митохондриального генома. [14].

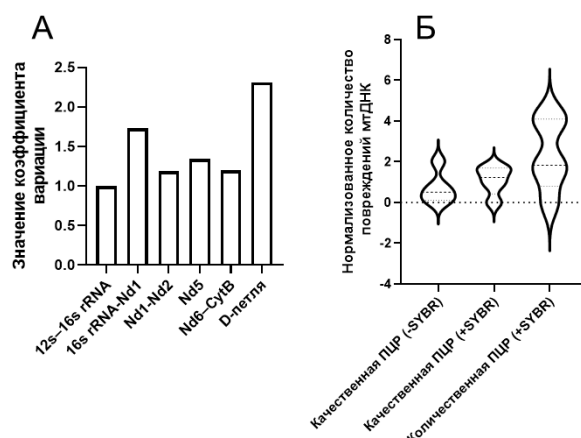


Рис. 3. Значения коэффициента вариации количества повреждений в каждом из шести амплифицированных фрагментах (А). Скрипичный график определения количества повреждений с использованием разных методов ПЦР (Б).

Fig. 3. Values of the coefficient of variation of the amount of damage in each of the six amplified fragments (A). A treble graph for determining the amount of damage using different PCR methods (B).

Стоит отметить выраженную неоднородность распределения повреждений в митохондриальном геноме скелетных мышц при выделении мтДНК с использованием различных методов. Расчет коэффициента вариации для шести амплифицированных фрагментов мтДНК продемонстрировал значительные межрегиональные различия, особенно выраженные в мышечной ткани. Максимальная вариабельность повреждений ($KB=2.31$) была обнаружена в области D-петли – ключевом регуляторном участке митохондриального генома, содержащем промоторы транскрипции и точки начала репликации тяжелой цепи [15]. Важно отметить, что именно в скелетных мышцах, характеризующихся высоким энергетическим метаболизмом и интенсивным образованием реактивных форм кислорода [16], D-петля проявляет особую уязвимость. Аналогичная закономерность, хотя и менее выраженная, наблюдалась для гена 16S рРНК и гена Nd1, расположенных в зоне терминации транскрипции тяжелой цепи (рис. 3А). Эти участки особенно чувствительны в условиях мышечной ткани, где постоянные циклы сокращения и расслабления создают дополнительную кальциевую нагрузку на митохондрии

[17] и, как следствие, на митохондриальный геном.

Еще одним важным методологическим аспектом, который необходимо было решить при оценке количества повреждений мтДНК в мышечной ткани, это сравнение чувствительности количественной и качественной ПЦР для оценки целостности митохондриального генома. Считается, что количественная ПЦР значительно более чувствительная, чем качественная [18]. Мы показали, что количественная ПЦР с использованием SYBR Green в качестве интеркалирующего флюоресцентного красителя демонстрирует более высокую чувствительность к повреждениям мтДНК по сравнению с качественными методами, такими как эндпоинт-ПЦР с последующей детекцией продукта с помощью флуориметра Qubit 2.0. Это связано с возможностью регистрации накопления продукта в реальном времени, что позволяет точно определять даже незначительные изменения в эффективности амплификации, вызванные повреждениями матрицы [19]. Ранее был показан ингибирующий эффект SYBR Green на амплификацию длинных фрагментов ДНК (>10 т.п.н.) [20]. Однако в нашем исследовании мы показали, что

SYBR Green не оказывал значимого эффекта на процессивность ДНК-полимеразы при амплификации фрагментов мтДНК мышц длиной около 2 т.п.н (рис.3Б). Использование количественной ПЦР значительно упрощает расчет количества повреждений благодаря возможности нормализации данных по короткому контрольному фрагменту и применению стандартных формул, таких как $2^{-\Delta\Delta C_q}$, что исключает необходимость трудоемких пост-ПЦР манипуляций, характерных для качественных методов.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует, что выбор метода выделения ДНК критически важен для последующего анализа митохондриального генома в мышечной ткани. Несмотря на высокий общий выход ДНК при преципитации, данный метод в меньшей степени подходит для исследований мтДНК из-за её низкого относительного содержания. Наибольшее содержание и сохранность мтДНК обеспечивают сорбционные методы на основе силикатных

мембран в колонках и магнитных частиц, тогда как использование сыпучих сорбентов приводит к значительной механической фрагментации митохондриального генома. Подтверждена высокая чувствительность количественной ПЦР в реальном времени с SYBR Green для детекции повреждений мтДНК, при этом краситель не ингибирует амплификацию фрагментов длиной ~2 т.п.н. Установлена повышенная уязвимость к повреждениям регуляторного региона D-петли. Следовательно, для получения достоверных результатов при изучении митохондриальной дисфункции в мышечной ткани рекомендовано использовать сорбционные методы на колонках или магнитных частицах в сочетании с количественной ПЦР-оценкой целостности мтДНК.

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. Gao F., Schon K.R., Vandrovcsa J., Wilson L., Hanna M.G. *Ann Clin Transl Neurol*. 2024; 12: 1680-1688. <https://doi.org/10.1002/acn3.52141>
2. Dubinin M.V., Mikheeva I.B., Stepanova A.E., Igoshkina A.D., Cherepanova A.A., Semenova A.A., Sharapov V.A., Kireev I.I., Belosludtsev K.N. *Biomolecules*. 2024; 14: 316. <https://doi.org/10.3390/biom14030316>
3. Gureev A.P., Nesterova V.V., Sadovnikova I.S. *DNA Repair (Amst)*. 2025; 146: 103812. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2025.103812>
4. Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo H.C., Ames B.N. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 288-293. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.288>
5. Preetha Sh. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 2020; 8: 39-45. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
6. Patent № 5705628. DNA purification and isolation using magnetic particles. Hawkins T. 1998. Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge. Mass.
7. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Starkov A.A., Popov V.N. *Toxicology*. 2017; 382; 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.03.010>
8. Gureev A.P., Nesterova V.V., Sadovnikova I.S. *DNA Repair (Amst)*. 2025; 146: 103812. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2025.103812>
9. Gonzalez-Hunt C.P., Thacker E.A., Toste C.M., Boularand S., Deprets S., Dubois L., Sanders L.H. *Sci Rep*. 2020; 10: 17293. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74195-6>
10. Gureev A.P., Andrianova N.V., Pevzner I.B., Zorova L.D., Chernyshova E.V., Sadovnikova I.S., Chistyakov D.V., Popkov V.A., Semenov D.S., Babenko V.A., Silachev D.N., Zorov D.B., Plotnikov E.Y., Popov V.N. *FEBS J*. 2022; 289: 5697-5713. <https://doi.org/10.1111/febs.16451>
11. Meyer J.N. *Ecotoxicology*. 2010; 19: 804-811. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0457-4>



12. Hettiarachchi E., Grassian V.H. *Langmuir*. 2024; 40: 27194-27205. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c02501>
13. Karpov S.I., Selemenev V.F. In-frakrasnaya spektroskopiya sorbenkov: uchebnoe posobie / Voronezh : Izdatel'ko-poligraficheskij centr «Nauchnaya kniga», 2024. 376 p. (In Russ.)
14. Malik A.N., Czajka A. *Mitochondrion*. 2013; 13(5): 481-492. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.10.011>
15. Mazunin I.O., Volod'ko N.V., Starikovskaya E.B., Sukernik R.I. *Molekulyarnaya biologiya*. 2010; 44(5): 755-772. (In Russ.)
16. Supruniuk E., Górski J., Chabowski A. *Antioxidants (Basel)*. 2023; 12(2): 501. <https://doi.org/10.3390/antiox12020501>
17. Williams G.S.B., Boyman L., Chikando A.C., Khairallah R.J., Lederer W.J. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(26): 10479-10486. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300410110>
18. Caliendo A.M., Schuurman R., Yen-Lieberman B., Spector S.A., Andersen J., Manjiry R., Crumpacker C., Lurain N.S., Erice A. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(4): 1334-1338. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1334-1338.2001>
19. Lehle S., Hildebrand D.G., Merz B., Malak P.N., Becker M.S., Schmezer P., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Rothfuss O. *Nucleic Acids Research*. 2014; 42: e41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1349>
20. Edwards J.G. *Mitochondrion*. 2009; 9: 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2008.11.004>

Информация об авторах / Information about the authors

И.С. Садовникова – младший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

П.И. Бабенкова – инженер-биолог кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

И.Ю. Буракова – младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

М.Ю. Сыромятников – ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, кандидат биологических наук, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

А.П. Гуреев – доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, доктор биологических наук, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

I.S. Sadovnikova – Junior Researcher, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

P.I. Babenkova – Biological Engineer, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russia

I.Yu. Burakova – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation

M.Yu. Syromyatnikov – Leading researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Ph.D (Biology), Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation

A.P. Gureev – Associate Professor, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, grand Ph.D (Biology), Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 05.09.2025; одобрена после рецензирования 19.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 05.09.2025; approved after reviewing 19.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.

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 «Диясфер» и «Наутилус»
- аналитические комплекты для экологического анализа и контроля подлинности и безопасности продуктов питания и кормов
- препаративные колонны динамического аксиального сжатия AXIOMA 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 AXIOMA для очистки субстанций с потоками элюента до 1 литра в минуту

К нам обращаются фармацевтические компании и другие организации для разработки технологий очистки субстанций «под ключ» и наработки стандартных образцов или примесей субстанций, когда это сложно или невыгодно делать на собственном производстве. Мы изучаем и сравниваем существующие методы очистки, опираясь на 30-летний опыт работы, добиваемся целевых показателей, масштабируем результаты, подбираем оборудование и расходные материалы, обучаем персонал заказчика. Не занимаемся технологиями очистки в нормально-фазовом режиме с применением органических растворителей в качестве элюентов.

Рассматриваем работы как по выделению и очистке небольших количеств субстанций или примесей, так и технологии очистки промышленного масштаба. Внедрим технологию на вашем производстве, используя современные непрерывные технологии очистки и колонки большого диаметра, увеличим производительность, снизим риск ошибок, обеспечим устойчивость технологического процесса.



Biotage



ChromaCon



KNAUER

Kromasil

ПРЕДСТАВЛЯЕМ ПРОДУКЦИЮ:

- **Biotage AB (Швеция)** – пробоподготовка, органический и пептидный синтез
- **Chromacon (Швейцария)** – препаративные системы для непрерывной хроматографии
- **Knauder GmbH (Германия)** – препаративная и аналитическая хроматография
- **Nouryon (Швеция)** – сорбенты и колонки для хроматографии
- **A.I.T.France (Франция)** – оборудование для безопасной работы с растворителями

Увеличьте производительность пептидного и органического синтеза, используя микроволновые реакторы Initiator+. Для быстрой очистки полученных соединений используйте флеш-хроматографы Select. Высокоскоростные упариватели позволят вам получить готовое вещество из раствора за считанные минуты. Быстрота получения результатов, удобство работы и надежность оборудования – девиз компании Biotage.

Компания Chromacon с препаративной хроматографической системой Contichrom не имеет аналогов в мире. Она позволяет в непрерывном режиме MCSGP нарабатывать высокоочищенные субстанции, а в режиме N-Rich – примеси с производительностью и качеством, недостижимыми 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.



- ✓ лабораторное оборудование
- ✓ лабораторная мебель
- ✓ химические реактивы
- ✓ лабораторная посуда



Вектон-Центр исполнит любой каприз для вашей лаборатории

Общество с ограниченной ответственностью «Вектон-Центр» было основано в 2007 году как представительство крупнейшей компании ЗАО «ВЕКТОН», г. Санкт-Петербург, которая уже более 20 лет занимается производством химических реактивов.

Первоначально основным направлением работы компании была поставка химических реактивов, посуды и расходных материалов для лабораторий. Сейчас мы занимаемся комплексным оснащением лабораторий практически во всех отраслях Российской промышленности, образования и науки. Мы готовы предоставить широкий ассортимент лабораторной мебели и оборудования различного назначения для применения в пищевой, тяжелой и легкой промышленности, а так же в нефтегазовой отрасли.

Современные потребности лабораторий предъявляют высокие требования к качеству используемого оборудования, химических реактивов и расходных материалов. Компания «Вектон-Центр» готова предложить лучшую продукцию для осуществления поставленных задач. Мы предъявляем высокие требования не только к поставляемой продукции, но и к работающему персоналу.

Сотрудники компании могут оказать профессиональную консультацию при подборе лабораторного оборудования, лабораторной мебели, химреактивов, посуды и расходных материалов для лабораторий.

6 причин для сотрудничества с нами



С нами надежно и спокойно
мы не исчезнем завтра с рынка - с 2007 года стабильно растем и развиваемся



С нами удобно
это действительно удобно, когда можно купить все необходимое в одном месте



Разные варианты оплаты
предоплата по договору в размере 100%, 50/50, 30/70 или отсрочка



С нами выгодно
предлагаем оптимальные цены, работаем по прайсам производителей



Любые варианты доставки
самовывоз, транспортная компания или с помощью наших машин



Система скидок и поощрений для наших постоянных клиентов

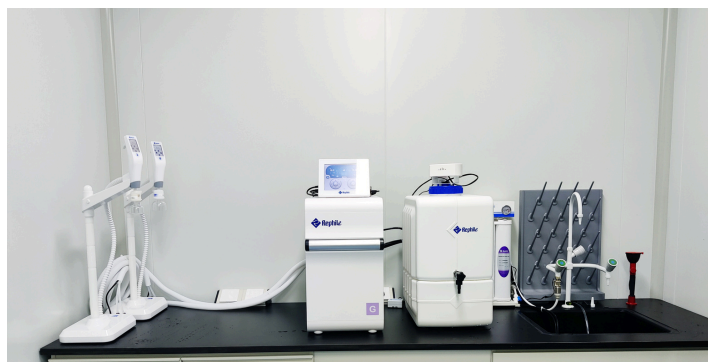
Для вас и за вас решим даже самые сложные задачи по комплексному оснащению лабораторий, созданию лабораторий под ключ, подбору оптимального оборудования под ваши цели с учетом технических требований.



Простые и сложные химические соединения, наборы



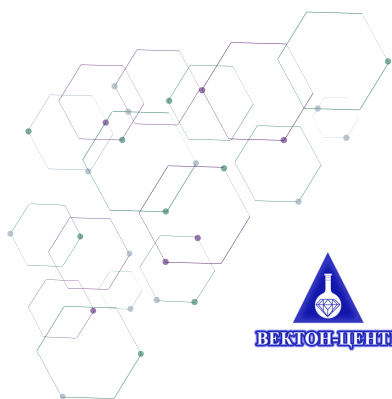
Лабораторный пластик, стекло, принадлежности



Общелабораторное и аналитическое оборудование



Лабораторная мебель различных конфигураций и цветов



Если вы согласны с тем, что время - деньги, приходите к нам за решением своих задач по оснащению лаборатории!

Задать вопросы или оставить заявку вы можете любым удобным способом:

по телефонам +7 (473) 260-20-54, +7 (473) 232-40-49
или по электронной почте vektionvm@list.ru

Подробную информацию о нас вы найдете на сайте www.vektionvm.ru
Адрес офиса: г. Воронеж, 394026, проспект Труда, 48/5, 2 этаж



Цена свободная

*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 10.12.2025. Формат 60×84 1/8
Дата выхода в свет 26.12.2025
Усл. печ. л. 18,37. Тираж 40 экз. Заказ 284.
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+