

федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Кемеровский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



**I Международная научно-практическая
конференция
«ХРОМАТОГРАФИЯ В ХИМИИ,
МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ:
актуальные вопросы, достижения и инновации»
посвященная памяти профессора
Кузнецова Петра Васильевича**

Кемерово
26 ноября 2021 г

**федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Кемеровский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Кафедра фармацевтической и общей химии

ЦНИЛ

**ХРОМАТОГРАФИЯ В ХИМИИ, МЕДИЦИНЕ И
БИОЛОГИИ: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ,
ДОСТИЖЕНИЯ И ИННОВАЦИИ**

материалы I Международной научно-практической конференции,
посвященной памяти профессора П.В. Кузнецова

Кемерово 2021

УДК 543.544: [54+57+61](082)

ББК 24.427.11я43

X 941

Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации : материалы I Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора П. В. Кузнецова (Кемерово, 26 ноября 2021 г.) / отв. ред. Е. М. Мальцева, А. С. Сухих. – Кемерово: КемГМУ, 2021. – 168 с.

В сборнике представлены материалы I Международной научно-практической конференции «Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации», посвященной памяти профессора П.В. Кузнецова, состоявшейся 26 ноября 2021 г. в Кемеровском государственном медицинском университете. Участники конференции – специалисты в областях адсорбции и хроматографии, биохимии, биоорганической химии, аналитической и физической химии, фармацевтической и токсикологической химии, фитохимии, клинической лабораторной диагностики, специалисты смежных областей, применяющих сорбционные и хроматографические методы, а также преподаватели, молодые ученые, аспиранты и студенты старших курсов ВУЗов

Редакционная коллегия выпуска:

доцент, д.м.н. Т.В. Пьянзова (Кемерово)

доцент, к.б.н. В.В. Большаков (г. Кемерово)

профессор, д.м.н. И.Ю. Журавлёва (г. Новосибирск)

профессор, д.фарм.н. Б.Н. Бекетов (г. Тюмень)

д.б.н. В.С. Бондарь (г. Красноярск)

доцент, к.фарм.н. Е.М. Мальцева (г. Кемерово)

доцент, к.фарм.н. А.С. Сухих (г. Кемерово)

доцент, к.м.н. С.Ф. Зинчук (г. Кемерово)

к.фарм.н. Е.Г. Поленок (г. Кемерово)

к.фарм.н. Ю.С. Фёдорова (г. Кемерово)

Отв. секретарь: к.фарм.н. Халахин В.В. (г. Кемерово)

Материалы публикуются в авторской редакции.

ISBN 978-5-8151-0170-8

© ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный
медицинский университет» Минздрава России, 2021



СОДЕРЖАНИЕ

СЕКЦИЯ 1. СОВРЕМЕННЫЕ СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ И МЕТОДЫ

ДЕУСОВА Е. С., ХАНЧЕВСКИЙ М. А., ПАШКОВИЧ В. С., КВАСЮК Е.И. СИНТЕЗ СЕКО-ИНОЗИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИОНООБМЕННОЙ СМОЛЫ ДАУЭКС 1 x 2	10
КОСТИНА А.С., ДОБРОШТАН А.В., КИСЕЛЕВА Н.В. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОТРАБОТАННЫХ СИЛИКАГЕЛЕВЫХ АДСОРБЕНТОВ В УСЛОВИЯХ КОНВЕРСИИ МЕТАНОЛА В ДИМЕТИЛОВЫЙ ЭФИР.....	15
НИКИТИНА Т.Г., НИКОНОРОВ В.В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БОРА В ПРИРОДНЫХ ВОДАХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.....	18
РАДАЕВА А.А., ЗАБОЛОЦКАЯ Е.Р. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛОМИКИ РАСТЕНИЙ.....	22
РОНЖИН Н.О., МОГИЛЬНАЯ О.А., ПОСОХИНА Е.Д., БОНДАРЬ В.С. ВЫДЕЛЕНИЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ОКСИДАЗЫ СО СМЕШАННОЙ ФУНКЦИЕЙ ИЗ ГРИБА <i>NEONOTHOPANUS LAMBI</i> И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ СВОЙСТВ	26
ТЕРЕНТЬЕВ А.С., МУТОВАЛОВ И.И., СИДОРОВ А.Ю., БЕДУЛЕВА Л.В. , МЕНЬШИКОВ И.В. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СВОЙСТВ.....	31
СЕКЦИЯ 2. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	
АГЕЕВА В.А. ШУБИНА Е.Н. ЖУКОВА И.Ю. АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ХИМИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ СПИРТОВ ДО НИТРИЛОВ НА ОСНОВЕ ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ	37

АНОСОВА Л.С., АГАФОНОВ А.М. ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАПРОКСЕНА И ПАРАЦЕТАМОЛА МЕТОДОМ ГЖ-МС В КОМБИНИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ....	40
БАТАШЕВ С.А., СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., ДЕМЕРЛИЙ А.М. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕАКЦИОННОЙ МАССЫ МЕТОКСИКАРБОНИЛИРОВАНИЯ ЦИКЛОГЕКСЕНА В ПРИСУТСТВИИ RuCl₃.....	45
БАТАШЕВ С.А., СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧИСТОТЫ 2-ХЛОР-4-НИТРОАНИЛИНА.....	48
БАТАШЕВ С.А., СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСИ 2,6-ДИНИТРОАНИЛИНА В 2,4-ДИНИТРОАНИЛИНЕ МЕТОДОМ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.....	51
ДЕМЕРЛИЙ А.М., СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., БАТАШЕВ С.А. ХРОМАТОГРАФИЯ В ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОДУКТОВ МЕТОКСИКАРБОНИЛИРОВАНИЯ ОКТЕНА-1.....	54
ОСТРОВЕРХОВ П.В., ЛОБАНОВ И.А., АФАУНОВ А.А., МАРЦИНКЕВИЧ Е.М., ХАСХАНОВА И.М., ВЛАСОВА К.Ю., АБАКУМОВ М.А. РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА И ЕГО СЛОЖНОЭФИРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ.....	59
СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., БАТАШЕВ С.А. МЕТОД ГЖХ В ОПРЕДЕЛЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОДУКТОВ МЕТОКСИКАРБОНИЛИРОВАНИЯ ОКТЕНА-1 В СРЕДЕ ТОЛУОЛА	63
СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., БАТАШЕВ С.А. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОДЫ В N-МЕТИЛПИРРОЛИДОНЕ	66
СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., БАТАШЕВ С.А. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА РЕАКЦИОННОЙ МАССЫ АЛКОКСИКАРБОНИЛИРОВАНИЯ ЦИКЛОГЕКСЕНА ЦИКЛОГЕКСАНОЛОМ И СО	69

ЧУБУКИНА Т.К.
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФИРНО-МАСЛИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ
РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ МЕТОДОМ ХРОМАТОМАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ.....** 73

ЯКОВЕЦ Н.В., КРУТЬКО Н.П.
**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГАЗООБРАЗНЫХ И
ЖИДКИХ ПРОДУКТОВ ТЕРМОЛИЗА НЕФТЯНЫХ
ОСТАТКОВ.....** 76

СЕКЦИЯ 3. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

АВЕРЬЯНОВА Е.В.
**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ПОЛИФЕНОЛОВ ОБЛЕПИХОВОГО ШРОТА.....** 83

АДАМОВА А.А., ГЕНЕРАЛОВА Ю.Э.
**ПОДБОР ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ДЛЯ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАФАМИДИСА.....** 87

АЛЕКСЕЕВ Е.Ю, КОЧУРОВА Е.В.
**ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА ВОДЫ НА ПРОЦЕНТ
ИЗВЛЕЧЕНИЯ ДИФЛУБЕНЗУРОНА ИЗ СУХОЙ ПОЧВЫ ПРИ
ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПО МЕТОДУ
QUESNERS В СОЧЕТАНИИ С ВЭЖХ-УФ АНАЛИЗОМ.....** 90

АРТАМОНОВ И.В.
**ОСОБЕННОСТИ РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ
МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С
ПОСТКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИЕЙ НИНГИДРИНОМ** 94

БАКАКИНА Ю.С., ШИНГЕЛЬ А.М., ПОХОДНЯ Е.Н.,
ПОХОДНЯ Ю.Г., СЯХОВИЧ В.Э.
**ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ
АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ И ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....** 99

БАКАКИНА Ю.С., БАБАРИКО Д.В., ШИНГЕЛЬ А.М.,
ДАНИЛЕНКО О.В., ПОХОДНЯ Ю.Г., СЯХОВИЧ В.Э.
**ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ГЛИКОПРОТЕОМНОГО
ПРОФИЛЯ КЛЕТОК ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО РАКА В**

УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ПРОТЕОМИКИ.....	104
БЕЛАШОВА О.В. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСТРАКТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ШЛЕМНИКА ОБЫКНОВЕННОГО И КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО.....	108
БУРЖИНСКАЯ Т.Г., ДЕЙНЕКА В.И., ДЕЙНЕКА Л.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ ДЛЯ ПОИСКА ПЛОДОВ <i>CAPSICUM ANNUUM</i>, ОБОГАЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫМИ ЗЕАКСАНТИНА.....	111
КИЛЬДЮШКИН Д.А., ЛИТВИН Е.А., ПЕТУХОВ А.Е. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРФИРИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПАЦИЕНТОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ С ДИАГНОСТИЧЕСКИМИ ЦЕЛЯМИ.....	115
ЛЕ В.М. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БИОМАССЫ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАВОЛГИ ВЯЗОЛИСТНОЙ ПО ДАННЫМ ВЭЖХ	120
МИХАЙЛОВА П.А., ГЕНЕРАЛОВА Ю.Э. ИЗУЧЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ ДИФЛУНИЗАЛА	124
НЕСТЕРОВА Н.В. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ МУШМУЛЫ (<i>FOLIA MESPILLI</i>).....	128
ОЛЕЙНИЦ Е.Ю., ДЕЙНЕКА В.И. ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ: ЗАМЕНА АЦЕТОНИТРИЛА НА ЭКОЛОГИЧЕСКИ БОЛЕЕ ПРИЕМЛЕМЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ ПРИ СОВМЕСТНОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ КОФЕИНА И ХЛОРОГЕНОВЫХ КИСЛОТ.....	131
ЦЕЧЁЕВ А.Т, КАРПЕНКО Ю.Н. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ КОЭФФИЦИЕНТА ЛИПОФИЛЬНОСТИ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ С ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ	135

СЕКЦИЯ 4. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- ВОЛКОВА Н.А., КУРКИН В.А., ПРАВДИВЦЕВА О.Е.
ИЗУЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ В СЫРЬЕ БОЯРЫШНИКА..... 141**
- ГОЛОВИНА Н.В., ДОБРОХОТОВ Д.А., НЕСТЕРОВА О.В. ,
ФИЛИППОВА А.А., ГАРНОВА Н.Ю.
СОЗДАНИЕ УНИФИЦИРОВАННОЙ МЕТОДИКИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ
РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ СТУДЕНЧЕСКОГО ПРАКТИКУМА
В РАМКАХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ДЛЯ
МЕДИЦИНСКИХ ВУЗОВ..... 144**
- ГРИШАЕВА О.В., ЕГОРОВА И.Н., ГОРБУШИНА И.С.
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАРОТИНОИДОВ РАЗЛИЧНЫХ
СОРТОВ ТЫКВЫ МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ..... 148**
- ЕГОРОВА Н.О., ЕГОРОВА И.Н., МАЛЬЦЕВА Е.М., СУХИХ А.С.
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ФЛАВАН-3-ОЛОВ И
ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ В КОРНЕВИЩАХ
С КОРНЯМИ КРОВОХЛЁБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ И
ТОНКОЛИСТНОЙ МЕТОДОМ ТСХ С ДЕНСИТОМЕТРИЕЙ... 152**
- ЛОЗЮК Ю.Г., ТАРАСОВА Е.Е., ХАНЧЕВСКИЙ М.А.
ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДНОГО И СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТОВ
РОМАШКИ И ЗВЕРОБОЯ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ..... 157**
- ЛОЗЮК Ю.Г., ТАРАСОВА Е.Е., ХАНЧЕВСКИЙ М.А.
ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ВОДНОГО И СПИРТОВОГО
ЭКСТРАКТОВ ЭВКАЛИПТА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ..... 160**
- МАЛЬЦЕВ М.Д., МАЛЬЦЕВА Е.М., ЕГОРОВА И.Н.
ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЯ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ В ТРАВЕ И
КОРНЕВИЩАХ КИПРЕЯ УЗКОЛИСТНОГО (*EPILOBIUM
ANGUSTIFOLIUM L.*)..... 164**

**СОВРЕМЕННЫЕ
СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ
ПРОЦЕССЫ И МЕТОДЫ**

ДЕУСОВА Е. С., ХАНЧЕВСКИЙ М. А., ПАШКОВИЧ В. С.,
КВАСЮК Е.И.

**СИНТЕЗ СЕКО-ИНОЗИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ИОНООБМЕННОЙ СМОЛЫ ДАУЭКС 1 x 2**

*Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета,
Республика Беларусь, г. Минск
e-mail: liza20010226@gmail.com*

DEUSOVA E. S., KHANCHEVSKIY M. A., PASHKOVICH V. S.,
KVASYUK E. I.

**SYNTHESIS OF SECO-INOSINE USING DOWEX 1 x 2
ION-EXCHANGE RESIN**

*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus
e-mail: liza20010226@gmail.com*

Аннотация: на примере инозина проведено сравнительное изучение различных методов окисления рибозного фрагмента нуклеозидов в диальдегидные производные (секо-нуклеозиды). Показано, что использование в качестве окислителя анионообменной смолы Дауэкс 1x2 (100–200 меш) в периодатной форме в сравнение с классическим методом, использующим натрия периодат, приводит к упрощению метода выделения и повышению выхода инозин-диальдегида до 91%.

Abstract: on the example of inosine, a comparative study of various methods of oxidation of the ribose fragment of nucleosides into dialdehyde derivatives (seco-nucleosides) was carried out. It is shown that the use of anion exchange resin Dowex 1x2 (100-200 mesh) in periodate form as an oxidizer in comparison with the classical method using sodium periodate leads to a simplification of the isolation method and an increase in the yield of inosine dialdehyde up to 91%.

Ключевые слова: секо-нуклеозиды, инозин, инозин-диальдегид, Дауэкс 1x2.

Keywords: seco-nucleosides, inosine, inosine-dialdehyde, Dowex 1x2.

Цель исследования. Получение секо-инозина с использованием ионообменной смолы в качестве реагента.

Материалы и методы исследования. Контроль за протеканием реакции и содержанием инозина и инозин-диальдегида проводился с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Kieselgel 60 F₂₅₄» фирмы «Merck» (Германия) в системе растворителей: хлороформ / метанол (4:1 об/об). Визуализация соединений осуществлялась просмотром пластинок в ультрафиолетовом свете или с использованием цветной реакции после опрыскивания пластинки 0,2% спиртовым раствором

нафторезорцина в присутствии серной кислоты с последующим её прогреванием при 90–100°C. Ультрафиолетовые спектры записаны на спектрофотометре UV-2500PC («Shimadzu», Япония).

Результаты исследования и их обсуждения. Синтез инозин-диальдегида осуществляли по схеме, представленной на Рис. 1.

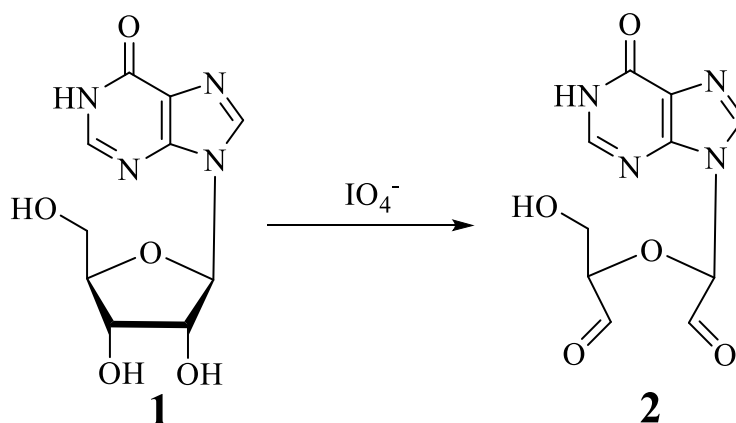


Рисунок 1 – Схема синтеза инозин-диальдегида

Пример 1. Получение инозин-диальдегида классическим методом.

К раствору инозина **1** (1г, 3.73 ммоль) в 40 мл воды добавляли при перемешивании с помощью магнитной мешалки раствор 0.96 г (4.47 ммоль) NaIO_4 . Полученную смесь перемешивали в течение 30 минут, до полного растворения натрия перйодата. Его избыток разрушали добавлением 1 мл этиленгликоля. В процессе периодатного окисления инозина происходит образования инозин-диальдегида **2** с восстановлением натрия перйодата до натрия йодата. Натрий йодат осаждали добавлением насыщенного раствора хлорида бария (0.93 г, 4.47 ммоль). Выпадающий при этом осадок барий йодата отфильтровывали. Полученный раствор концентрировали в вакууме при температуре ≤ 30 °C досуха на роторном испарителе, остаток перекристаллизовывали из 20 мл метанола при нагревании.

Получено 0,72 г инозин-диальдегида, не содержащего, согласно данным ТСХ, примеси побочных продуктов (Рис. 2). Выход секо-инозина составил 76%.

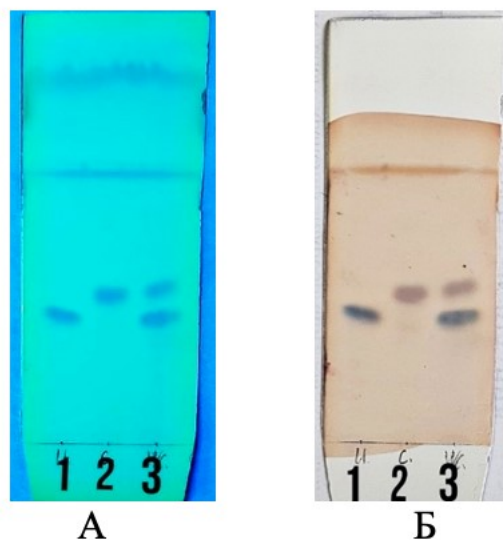


Рисунок 2 – Хроматографическая пластинка примера 1 (А – под ультрафиолетом, Б – обработанная нафторезорцином; 1 - инозин, 2 - инозин-диальдегид, 3 – инозин и инозин-диальдегид)

Пример 2. Получение инозин-диальдегида с использованием анионообменной смолы Дауэкс1х2.

Для данного синтеза использовали 10 мл анионообменной смолы Дауэкс1х2 (100–200 меш) в IO_4^- - форме. Для перевода смолы из Cl^- -формы в IO_4^- -форму, хроматографическую колонку со смолой предварительно промывали 0,5 М раствором натрия гидроксида, затем водой до нейтральной реакции выходящей из колонки воды. После этого колонку промывали раствором натрия периодата (2 г в 70 мл воды).

Избыток периодата натрия удаляли со смолы промыванием её водой до отрицательной реакции на периодат ион (поглощение в ультрафиолетовом свете и качественная реакция с ионом серебра). Для контроля полноты удаления периодат ионов с ионообменной смолы использовали раствор нитрата серебра, при добавлении которого в элюат, содержащий даже следовые количества ионов IO_4^- , выпадает коричневый осадок периодата серебра.

Заряженную ионами IO_4^- смолу добавляли при перемешивании к раствору инозина в воде, и перемешивали суспензию в течение 10 минут. Смолу наносили на хроматографическую колонку и элюировали 500 мл воды для полной десорбции продукта со смолы.

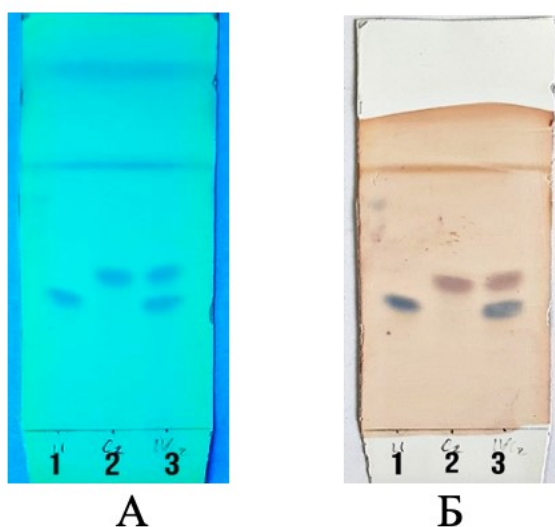


Рисунок 3 – Хроматографическая пластинка примера 2 (А – под ультрафиолетом, Б – обработанная нафторезорцином; 1 - инозин, 2 - инозин-диальдегид, 3 – инозин и инозин-диальдегид)

Полученный раствор концентрировали в вакууме при температуре $\leq 30^{\circ}\text{C}$ досуха на роторном испарителе. Осадок инозин-диальдегида сушили при комнатной температуре до постоянного веса. Было получено 0,87 г (91%) инозин-диальдегида. ТСХ продукта и его УФ-спектры, записанные для водных растворов при различных значениях рН, представлены на рисунках 3 и 4, соответственно.



Рисунок 4. Ультрафиолетовые спектры инозин-диальдегида. 1 – (рН 7), 203 нм; 2 – (рН 1), 203 нм; 3 – (рН 11), 252 нм, 320 нм.

Выводы. Метод получения нуклеозид-диальдегидов с использованием натрия перйодата разработан в 1960 г. Достоинством этого метода является его простота проведения синтеза. Окисление инозина перйодатом натрия приводит к образованию нуклеозид-диальдегида и натрий йодата в качестве побочного продукта. К недостаткам метода относится необходимость избавляться от примеси натрий йодата, и последующая перекристаллизация продукта реакции из токсичного метанола, что снижает выход инозин-диальдегида до 76%.

Преимущество метода синтеза с использованием анионообменной смолы в IO_4^- -форме заключается в том, что конечный продукт реакции получается без примеси неорганических соединений. Это исключает из процесса стадию перекристаллизации и повышает выход инозин-диальдегида до 91%.

Сравнение двух методов получения инозин-диальдегида свидетельствует о том, что метод окисления диольной группировки нуклеозидов с помощью ионообменной смолы Дауэкс 1x2 (100–200 меш) в IO_4^- -форме имеет преимущества перед традиционным методом, использующим NaIO_4 .

КОСТИНА А.С., ДОБРОШТАН А.В., КИСЕЛЕВА Н.В.
**КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОТРАБОТАННЫХ
СИЛИКАГЕЛЕВЫХ АДсорбЕНТОВ В УСЛОВИЯХ КОНВЕРСИИ
МЕТАНОЛА В ДИМЕТИЛОВЫЙ ЭФИР**

*Кубанский государственный университет, г. Краснодар
e-mail: annakostina0@gmail.com*

KOSTINA A.S., DOBROSHTAN A.V., KISELEVA N.V.
**CATALYTIC PROPERTIES OF SPENT SILICA GEL ADSORBENTS IN
CONVERSION OF METHANOL TO DIMETHYL ETHER**

*Kuban State University, Krasnodar
e-mail: annakostina0@gmail.com*

Аннотация: работа посвящена исследованию каталитической активности силикагелевых адсорбентов марки BASF KC-Trockenperlen H, используемых при очистке природного газа, а также установлению факторов, оказывающих влияние на их каталитическую активность, в условиях конверсии метанола в диметиловый эфир. Получены зависимости концентрации образующегося диметилового эфира от температуры протекания реакции. Установлено снижение термокаталитической активности адсорбента в условиях конверсии метанола в диметиловый эфир во времени в процессе работы установок подготовки газа к транспорту, что накоплением различных органических компонентов (турбинного масла).

Abstract: This paper is devoted to the study of the catalytic activity of silica gel adsorbents BASF KC-Trockenperlen H used in natural gas purification, and the establishment of factors influencing their catalytic activity in conversion of methanol to dimethyl ether. The dependences of the concentration of dimethyl ether on the temperature of the reaction are obtained. A decrease in the catalytic activity of the adsorbent under the conditions of conversion methanol to dimethyl ether over time during the operation of gas treatment units was found. This is due to the accumulation of various organic components (turbine oil).

Ключевые слова: природный газ, метанол, конверсия, диметиловый эфир, силикагелевый адсорбент, турбинное масло.

Keywords: natural gas, methanol, conversion, dimethyl ether, silica gel adsorbent, turbine oil.

При транспортировке природного газа в магистральных газопроводных системах могут образоваться газовые гидраты, ухудшающие или делающие невозможным транспорт газа [1]. В России в условиях низких температур распространено ингибирование метанолом в связи с его низкой стоимостью и высокой эффективностью. Однако применение метанола имеет и отрицательные свойства – его высокая токсичность и пожароопасность. Одним из способов его утилизации является образования менее токсичного

диметилового эфира за счет конверсии метанола в присутствии катализатора (оксида алюминия) в составе промышленных адсорбентов в установках подготовки газа к транспорту (УПГТ) на стадии регенерации при 280–290°C.

Снижение каталитической активности применяемых в УПГТ промышленных адсорбентов в конверсии метанола в диметиловый эфир может зависеть от ряда факторов – степени кристалличности и закоксовывания поверхности адсорбентов, а также сорбции на них других компонентов. Например, причиной дезактивации обладающих повышенной кислотностью катализаторов переработки природного газа может закоксовывание адсорбентов в результате термических превращений алканами и олефинами при температурах выше 300°C [2].

Цель исследования. Изучение каталитической активности промышленных адсорбентов марки BASF KC-Trockenperlen WS, используемых при очистке природного газа, в условиях конверсии метанола.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования были свежие и отработанные промышленные образцы силикагелей марки BASF KC-Trockenperlen H (BASF Catalysts Germany GmbH), применяемые при очистке природного газа.

Конверсию метанола в диметиловый эфир проводили на установке проточного типа в диапазоне температур 160–350°C при атмосферном давлении и скорости азота, насыщенного метанолом, 1200 мл/мин. Продукты конверсии метанола анализировали на газовом хроматографе «Кристалл-2000 М» с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой 50 м×0,32 мм×0,50 мкм. Условия хроматографического разделения: температура колонки – 70°C, температура детектора – 230°C, температура испарителя – 200°C, скорость газа-носителя (азота) – 20 см/с, расход водорода – 25 мл/мин, расход воздуха – 250 мл/мин.

Синхронный термический анализ адсорбентов проводили методами термогравиметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии на приборе STA-409 PC LUXX. Линейный нагрев образцов осуществлялся в атмосферах воздуха и аргона в интервале температур 30–1000°C и 30–1100°C со скоростью 10°C/мин, соответственно.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные данные показали, что конверсия метанола и выход ДМЭ были максимальны на отработанных адсорбентах BASF KC-Trockenperlen H, отобранных в верхнем слое адсорбционной колонны. При 350°C конверсия метанола достигает 90 % масс., а выход диметилового эфира 2 % масс. Незначительный выход целевого продукта связан с загрязнением адсорбентов в процессе их работы на установках подготовки газа к транспорту аэрозолем турбинного масла, попадающего в систему очистки

газа через уплотнители нагнетателей газоперекачивающих агрегатов масла [3].

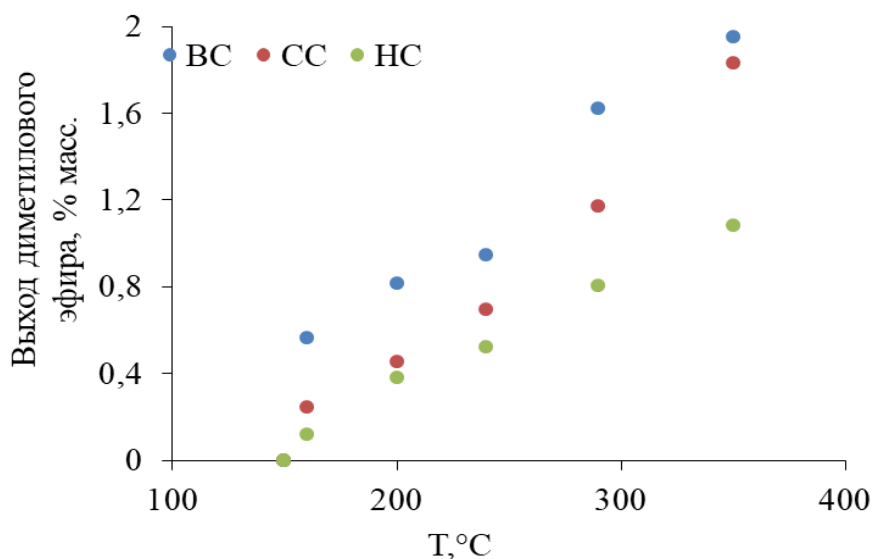


Рисунок 1. Зависимость выхода диметилового эфира от температуры на адсорбентах BASF KC-Trockenperlen, отобранных в верхнем (BC), среднем (CC) и нижнем (HC) слоях адсорбционной колонны

Методами синхронного термического анализа изучили исходные и отработанные образцы адсорбента для исследования процессов, приводящих к снижению каталитической активности силикагелей. При нагреве образцы теряли адсорбированную воду при 90–122°C в атмосфере воздуха с потерей массы 10–15 %. Диссоциация и удаление органических компонентов с отработанных адсорбентов сопровождалась тремя экзотермическими эффектами при 200–650°C, которые свидетельствовали об окислении «органики» кислородом воздуха. В атмосфере аргона удаление сорбированных органических компонентов протекает без окислительных процессов.

Выводы. Каталитическая активность отработанных силикагелевых адсорбентов марки BASF KC-Trockenperlen H изучена на лабораторной установке при атмосферном давлении, установлена зависимость концентрации диметилового эфира от температуры реакции. Накопление в образцах адсорбентов компонентов органического происхождения (турбинного масла) приводят к блокировке каталитических центров.

Список литературы

1. Bozorgian A. Investigation of hydrate formation kinetics and mechanism of effect of inhibitors on it, a review // Journal of Chemical Reviews. 2021. Vol. 3. № 1. P. 50-65.
2. Modeling of the catalytic cracking: Catalyst deactivation by coke and heavy metals / G.Yu. Nazarova [et al.] // Fuel Processing Technology Journal. 2020. Vol. 200. ID 106318.

3. Аналитический контроль загрязненности силикагелевого адсорбента компонентами турбинного масла в процессе очистки природного газа / Ю.А. Иванова [и др.] // Аналитика и контроль. 2020. Т. 24. № 3. С. 195-200.

НИКИТИНА Т.Г., НИКОНОРОВ В.В.
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БОРА В ПРИРОДНЫХ ВОДАХ МЕТОДОМ
КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

*Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет,
г. Санкт-Петербург
e-mail: tatiana.nikitina@pharminnotech.com*

NIKITINA T.G., NIKONOROV V.V.
**DETERMINATION OF BOROM IN NATURAL WATERS BY
CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD**

*Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, Saint-Petersburg
e-mail: tatiana.nikitina@pharminnotech.com*

Аннотация: оптимизирован состав рабочего буферного раствора для определения борат-ионов методом капиллярного зонного электрофореза с косвенным фотометрическим детектированием. Предложена методика электрофоретического определения борат-ионов в природных и питьевых водах после разложения бор-органических соединений концентрированной хлорной кислотой.

Abstract: the composition of the buffer solution for the determination of borate ions by capillary zone electrophoresis with indirect photometric detection has been optimized. The electrophoretic determination method of borate ions in natural and drinking waters after decomposition of boron-organic compounds with concentrated perchloric acid is proposed.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, борат-ионы, природные воды, питьевые воды, пробоподготовка

Keywords: capillary electrophoresis, borate, natural waters, drinking waters, sample pretreatment.

Цель исследования: оптимизировать условия электрофоретического определения бора в природных объектах.

Материалы и методы исследования:

Для приготовления рабочих буферных растворов и стандартного раствора бора были использованы следующие материалы: тетраборат натрия (ч.д.а., «Вектон»), гидроксид натрия («GR for analysis», Merck), бидистиллированная вода, кислота соляная (Sigma-Aldrich), гидроксид

хрома («Sigma-Aldrich»), диэтаноламин (ДЭА, ч.д.а., «Вектон»), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ, «Sigma-Aldrich»), хлорид натрия (ч.д.а., «Fluka»), сульфат натрия (ч.д.а., «Fluka»), дигидрофосфат натрия (ч.д.а., «Fluka»), карбонат натрия (ч.д.а., «Fluka»), концентрированная хлорная кислота (ч.д.а., «Вектон»).

Для реализации метода капиллярного электрофореза использовался прибор капиллярного электрофореза «Капель 105» со спектрофотометрическим детектором (длина волны детектирования 254 нм), немодифицированным кварцевым капилляром (внутренний диаметр 50 мкм, эффективная длина 50 см (общая длина – 60 см), внешний диаметр – 365 мкм. Диапазон рабочего напряжения от 1 до 25 кВ, с водным охлаждением капилляра (точность поддержания температуры - 0,01 °С). Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения «Мультихром для Windows, версия 1.5». Перед проведением анализа в режиме капиллярного электрофореза капилляр подготавливали к работе: промывали 1 М раствором NaOH, бидистиллированной водой, 1 М раствором HCl, бидистиллированной водой, 1 М раствором NaOH, бидистиллированной водой по 3 минуты и рабочим буферным электролитом – 15 минут. Между анализами капилляр промывали рабочим буферным электролитом в течение 5 минут.

Результаты исследования и их обсуждение: Бор является важным микроэлементом, так как участвует в поддержании функции клеточных мембран и ферментативных процессах, помогает предотвратить остеопороз и остеоартроз. Рекомендовано употребление 3 мг бора в день в качестве питательной добавки для нормального функционирования костной и иммунной систем организма человека. Однако, бор имеет тенденцию накапливаться в растительных и животных тканях и представлять потенциальную опасность для здоровья тех, кто употребляет пищу и воду с высоким содержанием бора [2]. В соответствии с СанПин 21.4.1116-02 содержание бора в питьевой воде первой категории не должно превышать 0.5 мг/л, а в воде высшей категории – 0.3 мг/л. В водах морей и океанов среднее содержание бора не превышает 5,0 мг/л. В России для определения бора в природных объектах существуют два государственных стандарта: определение бора в питьевой воде флуориметрическим методом с хроматроповой кислотой (ГОСТ Р 51210-98) и определение подвижных форм бора в почвах спектрофотометрическим методом с хинализарином или азометином Н (ГОСТ Р 50688-94). Однако, эти методы достаточно трудоемки, характеризуются недостаточной экспрессностью, обусловленной низкой скоростью образования комплексов бор-реагент, требуют использования концентрированных растворов кислот. Метод капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) широко используется для экспрессного определения заряженных компонентов питьевых и природных вод [1]. В предварительных экспериментах использовали методику

определения анионов в водных пробах, разработанную ООО «Люмэкс-маркетинг» (ПНД Ф 14.1:2:3:4.282-18). Оптимизация условий определения борат-иона методом КЗЭ заключалась в варьировании рН рабочего буферного раствора в диапазоне 8.8–11.5 для увеличения доли формы борат-иона в растворе. Составы использованных рабочих буферных растворов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Составы рабочих буферных растворов для определения борат-ионов методом КЗЭ

№	Состав буферного раствора	рН
1	5 мМ хромат, 20 мМ ДЭА, 1,65 мМ ЦТАБ	8.8
2	5 мМ хромат, 65 мМ ДЭА, 1,65 мМ ЦТАБ	9.6
3	5 мМ хромат, 17 мМ NaOH, 1,65 мМ ЦТАБ	11.5

Было установлено, что увеличение рН рабочего буферного раствора позволяет уменьшить время миграции борат-иона, вследствие увеличения его электрофоретической подвижности, улучшить асимметрию пика борат-иона, а также увеличить эффективность анализа (таблица 2.). Поэтому в дальнейших экспериментах использовали буферный раствор с рН=11.5.

Таблица 2. Основные параметры электрофоретического определения борат-ионов в зависимости от рН рабочего буферного раствора

рН	Время миграции борат-иона, t_m , мин	μ^1 , см ² /кВ·с	N^2	A_s^3	R_s^4
8.8	6.15	- 0.325	11750	3.2	8.1
9.6	5.07	- 0.395	12800	2.6	7.3
11.5	3.12	- 0.640	15300	2.3	6.1

¹электрофоретическая подвижность, ²эффективность анализа, ³асимметрия пика борат-иона, ⁴разрешение пиков борат- и фосфат-ионов.

Градуировочный график определения борат-ионов линеен в диапазоне концентраций 0.5–20.0 мг/л ($S = 10.842 \cdot C + 0.12$, $R = 0.998$), предел обнаружения, рассчитанный как $3 \cdot S_{\text{шум}}$, составил 0.04 мг/л. Электрофореграмма разделения стандартной смеси анионов представлена на рис.1.

При определении бора в пробах природных и питьевой воды использовали следующую пробоподготовку: пробу воды объемом 500 мл упаривали до влажных солей, обрабатывали концентрированной HClO₄ для разрушения бор-органических соединений, остаток количественно переносили в мерную колбу на 10 мл и анализировали. В таблице 3 представлены результаты определения бора в пробах питьевой и природной

воды после концентрирования в 100 раз. Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено».

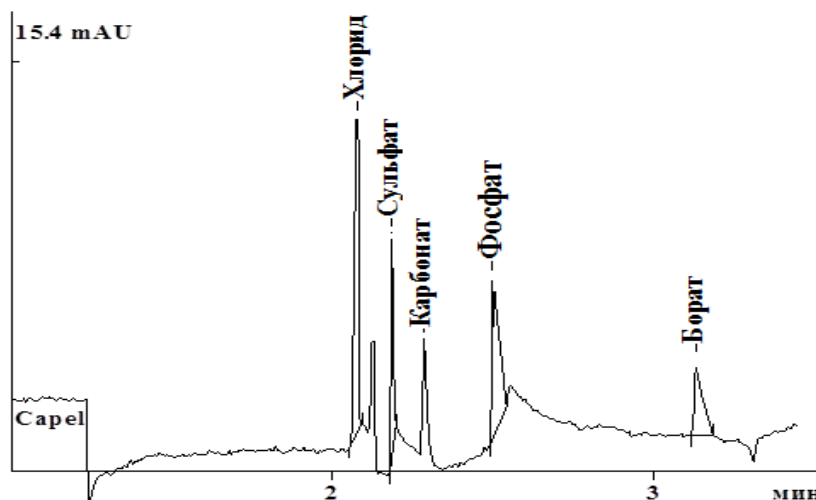


Рис.1. Электрофореграмма разделения модельной смеси анионов. Рабочего буферный раствор: 5 мМ хромат, 17 мМ NaOH, 1,65 мМ ЦТАБ (pH 11,5), напряжение -25 кВ, ввод пробы 300 мбар·с. Концентрации: хлорид-ион – 15 мг/л, сульфат-ион - 15 мг/л, карбонат-ион - 15 мг/л, фосфат-ион - 15 мг/л, борат-ион - 5 мг/л.

Таблица 3. Результаты определения содержания бора в природных водах после концентрирования на стадии пробоподготовки (n=5, p=0.95).

Проба воды	Найдено, мг/л	Введено, мг/л	Найдено с добавкой, мг/л
р. Нева	0.037 ± 0.005	0.050	0.090 ± 0.007
Финский залив	0.045 ± 0.006	0.050	0.098 ± 0.008
Водопроводная вода г. Санкт-Петербург	0.010 ± 0.002	0.010	0.022 ± 0.003

Выводы: выбран оптимальный состав рабочего буферного раствора, позволяющий проводить определение борат-ионов в природных водах методом капиллярного электрофореза.

Список литературы

1. Проблемы аналитической химии. Т.18. Капиллярный электрофорез. под.ред. Карцовой Л.А. М. «Наука» 2014. 442 С.
2. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М. «Мир». 2004, С.150-153.

РАДАЕВА А.А., ЗАБОЛОЦКАЯ Е.Р.
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ
ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛОМИКИ
РАСТЕНИЙ**

*Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина,
г. Санкт-Петербург
e-mail: anna.radaeva@bk.ru*

RADAEVA A.A., ZABOLOTSKAYA E.R.
**USE OF MODERN CHROMATOGRAPHY METHODS FOR STUDYING
PLANT METABOLOMICS**

*Leningrad State University named after A.S. Pushkin, Saint-Petersburg
e-mail: anna.radaeva@bk.ru*

Аннотация: В этой статье представлена важность метаболомики в изучении жизни растительных клеток, то, как их метаболические пути позволяют людям влиять на рост и развитие растений, и как это соотносится с комбинированным методом ГХ-МС и ЖХ-МС.

Abstract: This article presents the importance of metabolomics in studying plant cell life, how metabolic pathways enable humans to influence plant growth and development, and how this relates to a combined GC-MS and LC-MS method.

Ключевые слова: ГХ-МС, ЖХ-МС, метаболомика, сельское хозяйство, инженерия растений

Keywords: GC-MS, LC-MS, metabolomics, agriculture, plant engineering

Цель исследования. Изучить основные современные методы хроматографии и использование их в метаболомике.

Материалы и методы исследования. Исследование литературных источников, в том числе литература по биохимии, физической химии, метаболомике, физиологии и биохимии растений.

Введение. Газовая хроматография-масс спектрометрия (ГХ-МС) – это широко используемый аналитический метод, объединяющий возможности разделения и идентификации веществ. Объединение газовой хроматографии (ГХ) и масс спектрометрии (МС) позволило создать метод, который способен анализировать пробы с высокой точностью.

Создание этого метода позволило обеспечить улучшенную идентификацию исследуемых образцов, расширить диапазон анализируемых объектов и выдавать более быстрые результаты, что открывает целый ряд новых возможностей для ГХ-МС во многих областях.

За последние несколько лет стала активно развиваться метаболомика – наука, изучающая низкомолекулярные метаболические профили [2], в которой принято использовать газовую хроматографию-масс

спектрометрию и жидкостную хроматографию масс-спектрометрию (ЖХ-МС) вместе [6]. По сравнению с ГХ-МС, ЖХ-МС имеет более низкое хроматографическое разрешение, но это компенсируется анализом более широкого ряда соединений. Что позволяет при совместном использовании наиболее точно анализировать широкий спектр исследуемых веществ.

Количество метаболитов, которые можно идентифицировать в биологических жидкостях или тканях, варьируется в зависимости от используемых методов хроматографии и их комбинации [6]. Известно, что некоторые отдельные метаболиты могут быть проанализированы только с помощью ГХ или ЖХ. Однако в большинстве случаев необходимо обнаружить не один метаболит, а целую группу метаболитов. Таким образом, чтобы обнаружить изменения метаболитов в биологической системе, нужно провести метаболомический анализ, который охватывает широкий спектр групп метаболитов [2]. В связи с этим методы ГХ-МС и ЖХ-МС в основном используются вместе для полной идентификации всех измененных метаболитов во время анализа исследуемого организма.

Основная часть. Поскольку метаболом постоянно меняется, метаболомику можно обозначить наиболее точным отражением фенотипа клетки, ткани или организма [9].

Благодаря исследованию метаболома становится возможно правильно определить биохимический фенотип клетки или ткани [1,9], и поскольку изменения клеточных метаболитов соответствуют функциям генов, то метаболомику можно обозначить как важнейший инструмент в системной биологии и функциональной геномике.

Изменения в метаболоме могут возникать не только из-за воздействия окружающей среды [1], но также из-за физиологических изменений, патологических или инфекционных заболеваний или взаимодействия с лекарствами и другими внешними стимулами [1]. Поэтому метаболомика имеет перспективы применения в нескольких областях, таких как пищевая биотехнология, сельское хозяйство и генная инженерия.

Метаболическое профилирование сельскохозяйственных культур

Метаболомика активно применяется для улучшения сельскохозяйственных культур, так как многие метаболиты уникальны для растений и играют важную роль в урожайности и питательных качествах сельскохозяйственных культур. Следовательно, метаболомика является одним из основных инструментов для изучения устойчивости к абиотическому стрессу, устойчивости к патогенам, селекции сельскохозяйственных культур с помощью анализа метаболитов и влияния их на рост и развитие растений [4,7].

ГХ-МС профилирование трансгенных растений *Oryza sativa* показало, что повышенное количество трегалозы в листьях отвечает за повышенную устойчивость к засухе, соли и натрию. Кроме того, это приводило к значительным изменениям уровней сахаров, аминокислот и различных

органических кислот в листьях [8]. Также учеными было выявлено, что профилирование ГХ-МС может отслеживать влияние изменения климата на изменения метаболитов в рисе. Высокие ночные температуры привели к снижению содержания сахарных фосфатов и сахарозы и увеличению моносахаридов в метелках, что указывает на нарушение гликолиза и высокие потери углерода, вызванные дыханием [5].

Метаболомика представляет большой интерес для количественной оценки пищевых продуктов, включая анализ на молекулярном уровне и оценку их пищевой ценности. Этот метод применяли для индентификации метаболитических маркеров между двумя видами ягод годжи, которые трудно различить с помощью морфологических или молекулярных маркеров [3]. Применение ЖХ-МС и ГХ-МС позволило различить два вида *Lycium* в соответствии с их различным молекулярным составом, где у одного вида были обнаружены в избытке хлорогеновая кислота, аспарагин и хинная кислота, а у другого лицибарбарфенилпропаноиды АБ, кумаровая кислота, фруктоза и глюкоза.

Также метаботомика важна для отслеживания биосинтеза метаболитов во время роста и развития растений [10]. Например, профилирование на основе ЖХ-МС также дало представление о фитохимических вариациях и морфологии, в частности о цвете семян винной гречихи. Флавоноиды и антрахиноны были связаны с вариациями цвета семян, в то время как флавоноиды, в частности, с формой семян [10].

Метаботомика дает глубокое понимание как генетической, так и биохимической регуляции метаболизма. Полученная информация может быть полезна при оценке метаболитов, ответственных за качество питания и урожайности сельскохозяйственных культур, что является важной характеристикой для изучения с точки зрения селекции.

Применение метаботомики в инженерии растений

В разработке метаболитических путей растений часто возникают трудности, поскольку до сих пор отсутствует точное понимание путей синтеза генов, белков и метаболитов в биологических системах.

Профилирование метаболитов и сравнительный анализ состава выявили метаболитические изменения в ответ на модификацию генов у трансгенных сортов риса. Нарушение работы гена *OsSULTR3* привело к снижению содержания фитиновой кислоты [11] в трансгенном рисе, что в следствие положительно повлияло на его использование в качестве кормового сорта для животных. Фитат плохо усваивается животными с однокамерным желудком, а фитиновая кислота может взаимодействовать с важными микроэлементами в кишечном тракте, такими как цинк, что ухудшает их возможность для использования в сельском хозяйстве. Таким образом, фитиновая кислота широко рассматривается в качестве ключевого антипитательного вещества в кормах для животных с однокамерным желудком, а также в пищевых продуктах для людей [11].

Крупномасштабные анализы профилей метаболитов позволили исследователям получить доступ к глобальным наборам данных о метаболитах и их соответствующих метаболических путях. Эффективная комбинация метаболомики с транскриптомикой и генетической модификацией играет важную роль для исследования функционирования генов и анализа метаболитов с целью улучшить коммерчески важные свойства или потенциал биологической активности растений.

Выводы. Метаболомика – это быстроразвивающаяся наука, которая заняла важное место в исследованиях биологии растений и превратилась в надежную систему для документирования огромных баз данных. Комбинации методов хроматографии, используемые в метаболомике, давно носят стандартизированный характер. Высокая точность и автоматизация процесса позволяют этой современной науке расширять свои границы и затрагивать все сферы жизни человека.

Метаболомика наряду с транскриптомикой применяется в исследованиях растений для идентификации функций генов, которые управляют всей биологической системой и устанавливают связь между генотипом и фенотипом в ответ на факторы окружающей среды и стрессовые условия. Метаболомика может различать биомаркеры, отвечающие за качество и урожайность сельскохозяйственных культур. Одним из будущих направлений будет объединение метаболомики с постгеномикой, чтобы исследовать генетические процессы внутри растений в ответ на их метаболизм.

Список литературы

1. Alseekh S., Tohge T., Wendenberg R., et al. / Identification and mode of inheritance of quantitative trait loci for secondary metabolite abundance in tomato // *Plant Cell* 2015 yr. Vol.27 485–502 p. doi: 10.1105/tpc.114.132266 (распих после 1 осн части)
2. Daviss, Bennett / Growing pains for metabolomics // *The Scientist* 2005 yr. Vol. 19 № 8, 25—28 p. (опр. метаболомики) (4)
3. Dumont D., Chastellier A., Danielato G., et al. / Multi-targeted metabolic profiling of carotenoids, phenolic compounds and primary metabolites in goji (*Lycium spp.*) berry and tomato (*Solanum lycopersicum*) reveals inter and intra genus biomarkers // *Metabolites* 2020 yr. Vol.10 422p. doi: 10.3390/metabo10100422 (ягоды годжи)
4. Gürbüz N., Frary A., Uluişik S., et al. / Health benefits and bioactive compounds of eggplant // *Food Chem* 2018 yr. Vol.268 602–610 p. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.093
5. Joshi R., Sahoo K., Singh A., et al. / Enhancing trehalose biosynthesis improves yield potential in marker-free transgenic rice under drought, saline, and sodic conditions // *J Exp Bot.* 2020 yr. Vol.71 653–668p. doi: 10.1093/jxb/erz462
6. Özge C. Z., Cemil C. Ey., Emirhan N., Tuba R., Sedef K. / Integration of GC–MS and LC–MS for untargeted metabolomics profiling // *Journal of*

Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2020 yr. Vol. 190,
doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113509

7. Poudel R., Bhinderwala F., Morton M., et al. / Metabolic profiling of historical and modern wheat cultivars using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy // Sci Rep 2021 yr. Vol.11 doi: 10.1038/s41598-021-82616-3

8. Schaarschmidt S., Glaubitz U., Lawas L., et al. / Season affects yield and metabolic profiles of rice under high night temperature stress in the field // Int J Mol Sci. 2021 yr. Vol.21 doi: 10.3390/ijms21093187.

9. Tong R., Cao Y., Zhou B. et al. / Metabolic profiles of moso bamboo in response to drought stress in a field investigation // Sci Total Environ. 2020 yr. Vol.720 doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137722.

10. Yang W., Dong G., Su Y., et al. / Liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolomics analysis of flavonoids and anthraquinones in *Fagopyrum tataricum* L. Gaertn. (tartary buckwheat) seeds to trace morphological variations. // Food Chem 2020 yr. Vol.331 doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127354.

11. Zhao H., Frank T., Tan Y., et al. / Disruption of OsSULTR3 reduces phytate and phosphorus concentrations and alters the metabolite profile in rice grains // New Phytol 2016 yr. Vol.11 926–939 p. doi: 10.1111/nph.13969

РОНЖИН Н.О., МОГИЛЬНАЯ О.А., ПОСОХИНА Е.Д., БОНДАРЬ В.С.
**ВЫДЕЛЕНИЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ОКСИДАЗЫ СО
СМЕШАННОЙ ФУНКЦИЕЙ ИЗ ГРИБА *NEONOTHOPANUS NAMBI*
И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ СВОЙСТВ**

Институт биофизики ФИЦ КИЦ СО РАН, г. Красноярск

e-mail: roniol@mail.ru

RONZHIN N.O., MOGILNAYA O.A., POSOKHINA E.D., BONDAR V.S.
**ISOLATION OF EXTRACELLULAR OXIDASE WITH MIXED
FUNCTION FROM *NEONOTHOPANUS NAMBI* FUNGUS AND STUDY
OF ITS PROPERTIES**

Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS, Krasnoyarsk

e-mail: roniol@mail.ru

Аннотация: Экстраклеточная оксидаза, катализирующая соокисление фенола с 4-аминоантипирином без добавления H_2O_2 , выделена из гриба *Neonothopanus nambi*. Фермент: является ФАД-содержащим мономерным белком с молекулярной массой 60 кДа, имеет величины K_m и V_{max} для фенола 0.21 мМ и $0.40 \text{ мкМ} \cdot \text{мин}^{-1}$, проявляет максимум активности при рН 5.0 и температурах 55-70°C, перспективен для аналитических приложений.

Abstract: Extracellular oxidase catalyzing the co-oxidation of phenol with

4-aminoantipyrine without the addition of H_2O_2 was isolated from the *Neonothopanus nambi* fungus. Enzyme is a FAD-containing monomeric protein with a molecular weight of 60 kDa, has K_m and V_{max} values for phenol of 0.21 mM and $0.40 \mu M \cdot min^{-1}$, exhibits a maximum of activity at pH 5.0 and temperatures of 55-70°C, and is promising for analytical applications.

Ключевые слова: Высшие грибы, мицелий, β -глюкозидаза, гель-фильтрационная хроматография, экстраклеточные ферменты, оксидаза, фенол, реакция азосочетания.

Keywords: Higher fungi, mycelium, β -glucosidase, gel-filtration chromatography, extracellular enzymes, oxidase, phenol, azo coupling reaction.

Высшие грибы являются природными источниками получения большого количества ценных веществ, востребованных в разных сферах деятельности человека – медицине, биологии, фарминдустрии, пищевой и химической промышленности [1]. Из базидиомицетов получают полимерные материалы (хитин, полисахариды), фармакологически активные соединения (в частности, с антиоксидантным, противоопухолевым, иммуномодулирующим и бактерицидным действием), ферменты и ферментные системы и т.д. Большой интерес исследователей связан с изучением медь-, гем- и ФАД-содержащих экстраклеточных оксидоредуктаз базидиальных грибов в качестве ферментов для аналитики [2]. Данные ферменты локализованы во внешнем имеющем сетчатую структуру слизистом слое клеточной стенки грибных гиф, представленную разветвленными β -D-глюканами [3]. Учитывая это, мы предложили новый вариант выделения экстраклеточных ферментов высших грибов обработкой их мицелия β -глюкозидазой, гидролизующей концевые остатки в β -D-глюканах, что нарушает слизистый слой снаружи грибных гиф и обеспечивает выход находящихся в нем ферментов во внешнюю среду [4]. Такой способ позволяет выделять пул экстраклеточных ферментов в относительно мягких условиях без разрушения биомассы грибного мицелия. В полученных указанным способом экстрактах из мицелия высшего гриба *Neonothopanus nambi* мы обнаружили фермент, который катализировал цветную реакцию соокисления фенола с 4-аминоантипирином (4-ААП) без добавления в реакционную смесь пероксида водорода, что отличало его от известных пероксидаз. Это позволило высказать гипотезу, что данный фермент является оксидазой со смешанной функцией.

Цель исследования. Выделение из мицелия гриба *N. nambi* обнаруженной экстраклеточной оксидазы и изучение ее физико-химических свойств.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлся высший гриб *N. nambi* IBSO 3293 (Коллекция микроорганизмов ССИБСО 836, ИБФ СО РАН, Красноярск). Биомассу мицелия в виде

шарообразных пеллет с большим количеством поверхностных гиф получали выращиванием гриба в погруженных условиях в жидкой в картофельно-сахарозной среде (HiMedia Laboratory, Индия). Инокулятом для культивирования являлся измельченный мицелий, выращенный на той же среде в чашках Петри. Выращивание пеллет мицелия проводили в течение 7-8 суток при температуре 27-28°C и постоянном перемешивании среды со скоростью 160-180 об/мин (Environmental Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Латвия). Полученные пеллеты извлекали из питательной среды и промывали деионизованной (ДИ) водой (Milli-Q system, Millipore, США) для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Схема выделения экстраклеточной оксидазы, катализирующей соокисление фенола с 4-ААП без участия экзогенной H_2O_2 , включала следующие этапы. Обработку суспензии пеллет мицелия β -глюкозидазой (Serva, Германия) в ДИ воде для извлечения экстраклеточных ферментов, концентрирование выделенных ферментов и удаление низкомолекулярных примесей фильтрацией полученного экстракта через мембрану с пределом исключения 30 кДа, разделение экстрагированных ферментов гель-фильтрационной хроматографией концентрата на колонке с Sephadex G-200 superfine (Pharmacia, Швеция) с использованием в качестве элюента водного раствора 50 мМ NaCl. Для оценки нативной молекулярной массы фермента в сравнительных экспериментах проводили хроматографию белковых маркеров: БСА (Sigma, США), цитохром С (Fluka, Германия). Активность изучаемой оксидазы в образцах оценивали цветной реакцией соокисления фенола (Fluka, Германия) с 4-ААП (Реахим, Россия). Уровень активности фермента определяли по выходу цветного продукта реакции (хинонимин), регистрируемому спектрофотометрически (UV-1800, Shimadzu, Япония) по поглощению при 506 нм. Хроматографические фракции с наибольшей ферментной активностью объединяли и концентрировали фильтрацией через мембрану 10 кДа. Белковый состав финального препарата и молекулярную массу выделенного фермента в денатурирующих условиях оценивали электрофорезом в 12.5% ПААГ с добавлением 0.1% SDS, используя в качестве маркеров набор белков с молекулярными массами 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа (Invitrogen Corporation, США). Концентрацию белка в образцах определяли общеизвестным биуретовым методом с использованием реагента Бенедикта и БСА в качестве стандарта.

Результаты исследования и их обсуждение. По данным SDS-электрофореза экстраклеточная оксидаза, выделенная из мицелия *N. nambi* по изложенной выше схеме, имеет высокую степень чистоты и содержит практически один доминантный белок с молекулярной массой около 60 кДа. Совпадение величин молекулярных масс изучаемой оксидазы в денатурирующих условиях и при гель-фильтрационной хроматографии позволяет говорить, что она является мономерным ферментом. В спектре поглощения водного образца оксидазы зарегистрированы пики при 390 и

457 нм, что указывает на наличие ФАД в молекуле фермента. Экспериментально показано, что ФАД не ковалентно связан с белковой частью фермента. После термообработки препарата оксидазы 5 мин при 100°C с последующим его диализом через мембрану 10 кДа ФАД обнаруживается спектрально в подмембранной фракции. Показано, что оксидаза наиболее эффективно катализирует соокисление фенола с 4-ААП при температурах 55-70°C и слабнокислых значениях рН среды с максимумом активности при рН 5. Величины кинетических параметров фермента K_m и V_{max} , рассчитанные из зависимости образования продукта реакции от концентрации фенола составили 0.21 мМ и 0.40 мкМ·мин⁻¹, соответственно. Выделенная оксидаза обладает высокой стабильностью – по крайней мере, при хранении водных образцов очищенного фермента в течение недели при 4°C не наблюдалось снижения его активности. Фермент достаточно термостабилен: после инкубации в течение часа при 30°C сохраняется до 70–75% начальной активности, при 50°C – около 30%.

Результаты исследований выделенного из гриба *N. nambi* экстраклеточного фермента, который катализирует соокисление фенола с 4-ААП без участия экзогенной H₂O₂ и содержит в своей молекуле ФАД, указывают на то, что он является оксидазой со смешанной функцией. При наличии фенола в водной среде он сначала генерирует пероксид водорода, который затем используется в реакции соокисления. Образование H₂O₂ под действием этой оксидазы подтверждается экспериментами с экзогенной каталазой, добавки которой в реакционную смесь (2–4 мкг в пробе) снижали выход цветного продукта реакции на 30-40%. В то же время, известны ФАД-содержащие ферменты, катализирующие образование H₂O₂ за счёт окисления циклических ОН-содержащих соединений (например, ароматических спиртов) и O₂ водной среды [5].

Выводы. С помощью обработки биомассы β-глюкозидазой из мицелия высшего гриба *Neonothopanus nambi* выделен пул экстраклеточных ферментов. Такой способ обработки имеет биотехнологическую значимость, поскольку позволяет без разрушения биомассы получать из мицелия базидиомицетов экстракты, обогащенные экстраклеточными грибными ферментами и содержащие малое количество балластных примесей. Гель-фильтрационной хроматографией из пула ферментов выделена оксидаза со смешанной функцией, катализирующая соокисление фенола с 4-ААП без добавления экзогенного пероксида водорода со значениями K_m и V_{max} для фенола 0.21 мМ и 0.40 мкМ·мин⁻¹. Выделенная оксидаза является ФАД-содержащим мономерным ферментом с молекулярной массой 60 кДа, имеет максимумы каталитической эффективности при 55-70°C и рН 5.0, обладает стабильностью при хранении в водном растворе при 4°C в течение недели. В целом совокупность физико-химических свойств фермента позволяют прогнозировать перспективность его применения в аналитических приложениях. Например, его

использование в сравнении с известными пероксидазами будет упрощать методику тестирования фенола в водной среде при биомониторинге ее загрязнений этим токсикантом и его аналогами.

Список литературы

1. Chang S.T., Wasser S.P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health // *Int. J. Med. Mushrooms*. 2012. V. 14. P. 95-134.

2. Martinez A.T., Ruiz-Duenas F.J., Camarero S. et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations // *Biotechnol. Adv.* 2017. V. 35. P. 815-831.

3. Daniel G., Nilsson T., Pettersson B. Intra- and extracellular localization of lignin peroxidase during the degradation of solid wood and wood fragments by *Phanerochaete chrysosporium* by using transmission electron microscopy and immuno-gold labeling // *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. V. 55. P. 871-881.

4. Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Bondar V.S. Estimating levels of light emission and extracellular peroxidase activity of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* treated with β -glucosidase // *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* 2018. V. 8. P.75-85.

5. Hernandez-Ortega A., Ferreira P., Martinez A.T. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 93. P. 1395-1410.

^{1,2}ТЕРЕНТЬЕВ А.С., ¹МУТОВАЛОВ И.И., ^{1,2}СИДОРОВ А.Ю.,
^{1,2}БЕДУЛЕВА Л.В., ^{1,2}МЕНЬШИКОВ И.В.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНОГО РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СВОЙСТВ

¹Удмуртский государственный университет, г. Ижевск

²Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Ижевск
e-mail: alts4m@yandex.ru

^{1,2}TERENTIEV A., ¹MUTOVALOV I., ^{1,2}SIDOROV A., ^{1,2}BEDULEVA L.,
^{1,2}MENSHIKOV I.

CHROMATOGRAPHIC ISOLATION OF HUMAN RHEUMATOID REGULATORY FACTOR AND STUDY OF ITS PROPERTIES

¹Udmurt State University, Izhevsk

²Udmurt Federal Research Center UB RAS, Izhevsk
e-mail: alts4m@yandex.ru

Аннотация: Для выделения регуляторного ревматоидного фактора (регРФ) из плазмы крови был получен аффинный сорбент, содержащий в качестве лиганда Fc фрагменты IgG человека, несущие регРФ эпитопы. Сорбент связывает регРФ и позволяет изолировать его из плазмы крови. Показано, что регРФ представлен иммуноглобулином класса G, его антигенсвязывающая активность чувствительна к низкому pH.

Abstract: To isolate the regulatory rheumatoid factor (regRF) from blood plasma, an affinity sorbent based on human IgG Fc fragments carrying regRF epitopes was obtained. The sorbent binds regRF and allows it to be isolated from blood plasma. It was shown that regRF is a class G immunoglobulin, its antigen-binding activity is sensitive to low pH.

Ключевые слова: регуляторный ревматоидный фактор, Fc фрагменты IgG, аффинный сорбент

Keywords: regulatory rheumatoid factor, IgG Fc fragments, affinity sorbent.

Цель исследования. Ранее нашей исследовательской группой был обнаружен новый фактор иммунорегуляции, получивший название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) [1]. РегРФ представляет собой отдельную популяцию антител, отличающуюся по специфичности от ревматоидного фактора, выявляемого у больных ревматоидным артритом [2]. РегРФ является антиидиотипическими антителами, каждое из которых имеет индивидуальный паратоп специфичный к идиотипу антиген-распознающего рецептора лимфоцитов, и общий паратоп служащий для узнавания активированных CD4 Т лимфоцитов [3]. Эпитопы, распознаваемые общим паратопом регРФ, могут быть искусственно

получены на папаиновых Fc фрагментах IgG. Стимуляция продукции регРФ конформерами Fc фрагментов IgG несущих регРФ эпитопы редуцирует симптомы коллаген-индуцированного артрита [1] и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита крыс [4]. Показано, что регуляторное действие регРФ основано на сдерживании экспансии активированных CD4 T лимфоцитов [5]. В чистом виде регРФ не выделен. Получение чистого препарата регРФ может позволить изучить его свойства. Поэтому целью исследования стала разработка аффинного сорбента на основе Fc фрагментов IgG человека, несущих эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором (регРФ эпитопы) для выделения регРФ из плазмы крови и его характеристика.

Материалы и методы исследования.

Плазма крови здоровых людей (n=7), содержащая регРФ была получена с БУЗ УР "РСПК МЗ УР". Fc фрагменты IgG человека для иммобилизации были получены методом, описанным ранее [4]. Аффинный сорбент конструировали на основе CNBr-активированной сефарозе 4В (GE Healthcare, Sweden). Полуколичественное определение уровня регРФ в плазме крови, а также в образцах, полученных после ее разделения на аффинном сорбенте, проводили методом агглютинации танализированных нагруженных IgG человека эритроцитов. Образцы фракции, элюируемой с аффинного сорбента исследовали методом электрофореза 3-15% градиентном полиакриламидном геле в SDS-PAGE, в восстанавливающих и диссоциирующих условиях. Анализ электрофореграмм проводили денситометрическим методом с помощью программы ImageJ (1.37v).

Результаты исследования и их обсуждение.

Аффинный сорбент для выделения регРФ из плазмы крови человека был получен путем иммобилизации Fc фрагментов IgG человека, несущих эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, на CNBr-активированную сефарозу 4В (CNBr-activated Sepharose 4В, GE Healthcare, Sweden). Для этого 10 мг Fc фрагментов смешивали с 1 мл гидратированного геля, инкубировали при постоянном перемешивании в течение 24 часов при 4⁰С в 0,05М натрий-фосфатном буфере рН 7,5, содержащем 0,1М NaCl. По завершении инкубации трижды отмывали дистиллированной водой. Инкубировали 15 минут в 0,1М Na-ацетатном буфере, рН 4,0, с последующей трехкратной отмывкой дистиллированной водой. Блокировку непрореагировавших нитрильных групп проводили 0,05М 2-аминоэтанолом, рН 9,0. Полученный сорбент трижды промывали 3ФР, рН 7,3.

Для выделения регРФ из плазмы крови человека 2 мл полученного аффинного сорбента инкубировали с 10 мл плазмы крови при постоянном перемешивании в течение 24 часов при 4⁰С. Анализ уровня регРФ в надосадке, полученном после инкубации плазмы крови с аффинным сорбентом, несущим Fc фрагменты, содержащие регРФ-эпитопы, показал,

что титр регРФ в образцах плазмы крови ($n=7$) снизился с $52,4 \pm 3,6$ до $2,7 \pm 3,5$. Данный факт позволяет предполагать, что регРФ связался с сорбентом и ожидаемо его наличие во фракции элюируемой с сорбента.

Элюцию регРФ с сорбента проводили при потоке $0,5$ мл/мин $0,1$ М глицин-HCl буфером, pH $2,8$ (рисунок 1), предварительно упаковав сорбент в колонку объемом 2 мл и отмыв от не связавшихся белков. Элюат нейтрализовали 1 М Трис-HCl буфером, pH $9,0$, концентрировали до 1 мг/мл в концентраторах Amicon Ultra 30000K (USA). Элюат проверяли на наличие в нем регРФ по способности вызывать агглютинацию танализированных IgG нагруженных эритроцитов. Также был выяснен белковый состав элюата методом электрофореза в ПААГ.

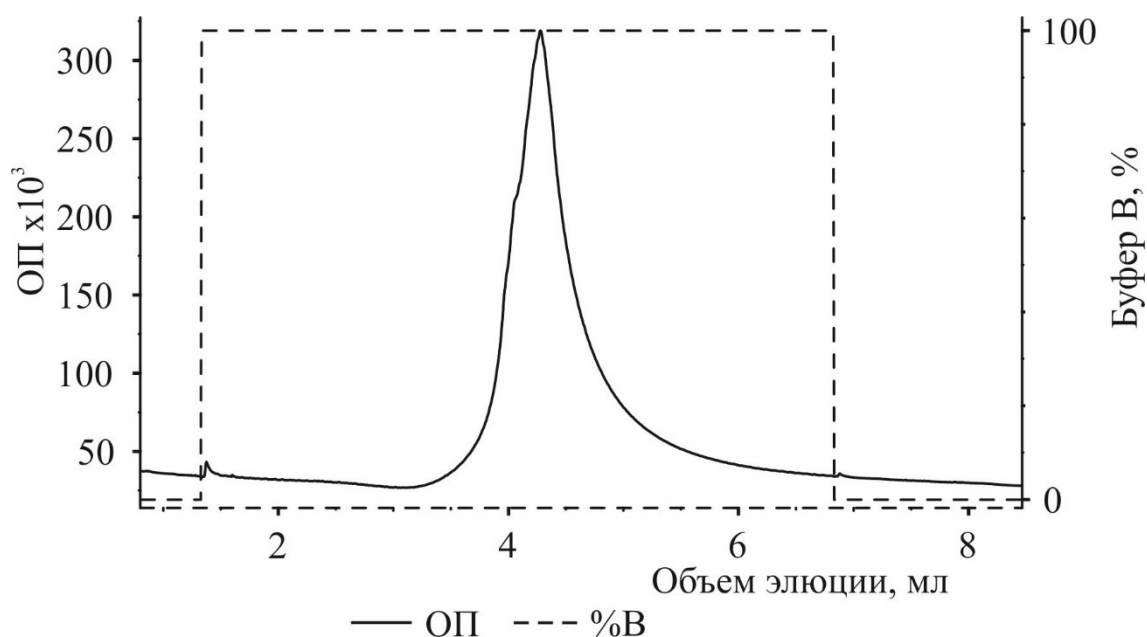


Рисунок 1. Хроматографический профиль элюции белка, связанного с аффинным сорбентом.

Обнаружено, что 6 из 7 тестируемых образцов элюата вызывали агглютинацию танализированных нагруженных IgG человека эритроцитов, что свидетельствует о содержании в элюате регРФ. Потеря активности одного из образцов может быть связана с тем, что для элюции используется низкий уровень pH, который приводит к потере антигенсвязывающей способности регРФ. Присутствие в элюате регРФ и снижение его уровня в плазме после ее инкубации с сорбентом вместе указывают на то, что аффинный сорбент с иммобилизованными Fc фрагментами IgG человека специфичен к регуляторному ревматоидному фактору и позволяет выделять его из плазмы крови.

Электрофоретический анализ элюата представлен на рисунке 2.

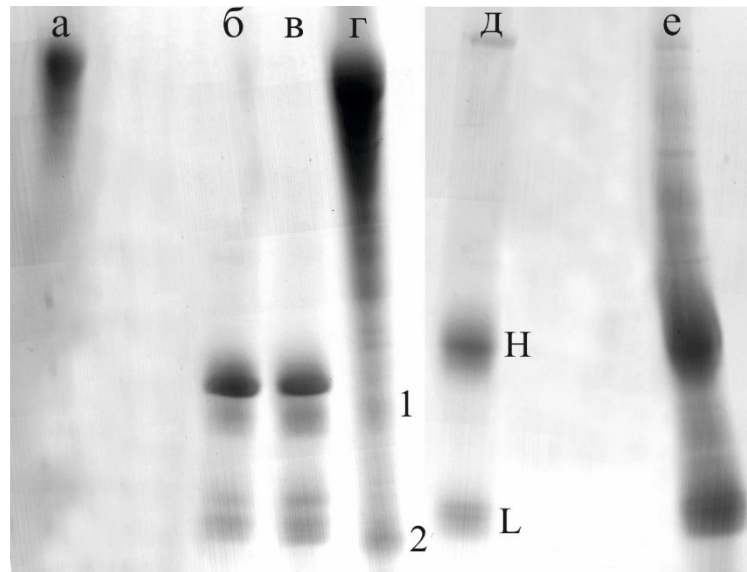


Рисунок 2. Электрофореграмма элюата плазмы крови, полученного с аффинного сорбента, несущего Fc фрагменты IgG. а-г – диссоциирующие условия, д-е – восстанавливающие условия. а,д – IgG; б,в – Fc фрагменты, использованные для иммобилизации г,е – элюат. 1,2 – примесные белки; Н – тяжелые цепи IgG, L – легкие цепи IgG.

На рисунке 2 видно, что основным компонентом элюата является IgG, содержание которого, по данным денситометрического анализа, составило 78 %. В диссоциирующих условиях обнаруживаются полосы примесных белков, подвижность которых сходна с подвижностью Fc фрагментов, что позволяет предполагать, что это Fc фрагменты, которые элюируются вместе с целевым белком. Таким образом, регРФ, выделенный на аффинном сорбенте из плазмы крови здоровых людей, представляет собой IgG.

С 2-х мл аффинного сорбента было элюировано 1,928 мг белка, 78% которого составил регРФ, сорбированный из 10 мл плазмы крови человека. Таким образом, полученный аффинный сорбент имеет сорбционную емкость для регРФ равную 752 мкг/мл. Расчётная концентрация регРФ составила 150,4 мкг в 1 мл плазмы, имеющей титр 1:64, определяемый в реакции агглютинации танизированных нагруженных IgG человека эритроцитов.

Выводы.

1. Аффинный сорбент (сефароза с иммобилизованными на ней Fc фрагментами IgG человека, несущими регРФ эпитопы) специфичен к регРФ, что подтверждается снижением титра регРФ-содержащей плазмы, инкубированной с сорбентом, и появлением регРФ во фракции элюируемой с сорбента.

2. РегРФ является иммуноглобулином класса G, и содержится в плазме крови здоровых людей в количестве от 75,2 до 150,4 мкг/мл, что

соответствует титрам регРФ равным 1:32 и 1:64, определяемым методом агглютинации танализированных нагруженных IgG человека эритроцитов.

3. Антигенсвязывающая активность регРФ чувствительна к низким рН.

Поддержка.

Исследование выполнено в рамках научного проекта, выполняемого в рамках государственного задания в сфере науки, Министерства науки и высшего образования РФ, № 0827–2020–0012, тема «Разработка терапевтической вакцины на основе конформеров Fc фрагментов IgG человека для лечения аутоиммунных заболеваний», 2020-2023.

Список литературы

1 Sidorov, A. Fc fragments of immunoglobulin G are an inducer of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases / A. Sidorov, L. Beduleva, I. Menshikov, A. Terentiev, E. Stolyarova, N. Abisheva // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol. 95. – P. 938–945.

2 Beduleva, L. Comparison of the specificity of rheumatoid factor detected by latex fixation with that of regulatory rheumatoid factor / L. Beduleva, A. Sidorov, K. Semenova, I. Menshikov, K. Fomina, N. Shklyayeva, L. Gilmanova // *J Clin Lab Anal*. – 2020. – Vol. 34, №12. – P. e23533.

3 Menshikov, I. The idiotypic network in the regulation of autoimmunity: Theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva, M. Frolov, N. Abisheva, T. Khramova, E. Stolyarova, K. Fomina // *J Theor Biol*. – 2015. – Vol. 375. – P. 32-39.

4 Beduleva, L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by IgG Fc fragments bearing regRF epitopes / L. Beduleva, T. Khramova, A. Sidorov, A. Terentiev, N. Abisheva, D. Menshikova, P. Ivanova, K. Fomina, A. Gorbushina, N. Shklyayeva, I. Menshikov // *International Immunopharmacology*. – 2021. – Vol.101, P. A. – P. 1083092021.

5 Stolyarova, E. Mechanism by which Regulatory Rheumatoid Factor Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / E. Stolyarova, L. Beduleva, I. Menshikov, A. Snigiryev, et al. // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. – 2018. – Vol. 18. – P. 596-601.

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

АГЕЕВА В.А. ШУБИНА Е.Н. ЖУКОВА И.Ю.
АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ХИМИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ
СПИРТОВ ДО НИТРИЛОВ НА ОСНОВЕ ГАЗОВОЙ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

*Донской государственный технический университет,
г. Ростов-на-Дону
e-mail: viktoriaageeva52@gmail.com*

AGEEVA V.A. SHUBINA E.N. ZHUKOVA I.Yu..
ANALYSIS OF PRODUCTS OF CHEMICAL OXIDATION OF
ALCOHOLS TO NITRILES BASED ON GAS CHROMATOGRAPHY-
MASS SPECTROMETRY

*Don State Technical University, Rostov-on-Don
e-mail: viktoriaageeva52@gmail.com*

Аннотация: в данной статье представлен анализ продуктов химического окисления спиртов, при помощи газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС), также описан принцип действия хроматографа Agilent 7890 А, на основе которого проводилась обработка полученных продуктов.

Abstract: this article presents an analysis of the products of chemical oxidation of alcohols using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), also describes the principle of operation of the Agilent 7890 A chromatograph, on the basis of which the processing of the obtained products was carried out.

Ключевые слова: газовая хроматография, хроматографическая колонка, химическое окисление, спирты, нитрилы.

Keywords: gas chromatography, chromatographic column, chemical oxidation, alcohols, nitriles.

Цель исследования. Разработать метод химического окисления спиртов до нитрилов, при последующей обработке результатов методом ГХ-МС.

Материалы и методы исследования. Спирты различного строения, хроматограф Agilent 7890 А, анализ научной литературы, лабораторный эксперимент, количественная и качественная обработка данных.

В настоящее время успех многих исследований в различных областях, за частую, зависит от эффективности и точности анализа газовой хроматографии. Газовая хроматография – это процесс качественного и количественного определения состава сложных смесей органических соединений. Одним из основных элементов газовой хроматографии является хроматографическая колонка, параметры которой определяют инструментальное оформление метода [1].

При помощи газовой хромато-масс-спектрометрии, которая осуществлялась на хроматографе Agilent 7890 A, снабжённом масс-селективным детектором Agilent 5975 C и капиллярной колонкой HP-5MS, был проведён анализ полученных компонентов. Данный хроматограф обладает высокой производительностью, за счёт наличия модулей электронного пневматического управления и управления температурой термостата газовой хроматографии.

Принцип действия хроматографа состоял в разделении смесей веществ при помощи колонки с последующим детектированием. Прибор оснащён электронным контролем газов, что позволяло быстро и просто устанавливать скорость потока и давления, а также установленные значения оставались стабильными. Данные библиотеки NIST, послужили основной базой, для распознавания принадлежности полученных веществ к определённым классам соединений, по полученным масс-спектрам.

Для управления прибором, сбора и обработки информации применяли пакет программ MSD ChemStation. Количественный анализ провели путём определения площадей пиков, автоинтегрированием при помощи программы MSD ChemStation [2].



Рисунок 2 - Газовый хроматограф с масс-селективным детектором Agilent 5977

Результаты исследования и их обсуждение. Было проведено исследование химического окисления спиртов различного строения до нитрилов. Среди алифатических – гексанол-1, гептанол-1, октанол-1, нонанол-1, среди ароматических это были 3,4-диметоксибензиловый, бензиловый и фенилэтиловый спирт.

Химический синтез проводили в плоскодонной конической колбе, где в качестве перемешивающего устройства была использована магнитная мешалка. Процесс окисления спиртов осуществляли каталитической системой 4-ацетиламино-ТЕМРО – йод в двухфазной среде хлористый метилен (CH_2Cl_2) – водный раствор NaHCO_3 с добавкой пиридиновых оснований, в соотношении 1:1, йод – служил вторичным окислителем для 4 АсNH-ТЕМРО [3].

На рисунке 1 представлена хроматограмма и масс-спектры одноатомного фурфуролового спирта через два часа окисления, где выход

продукта равен 82 %, спустя четыре часа синтеза выход нитрила составил 86 %.

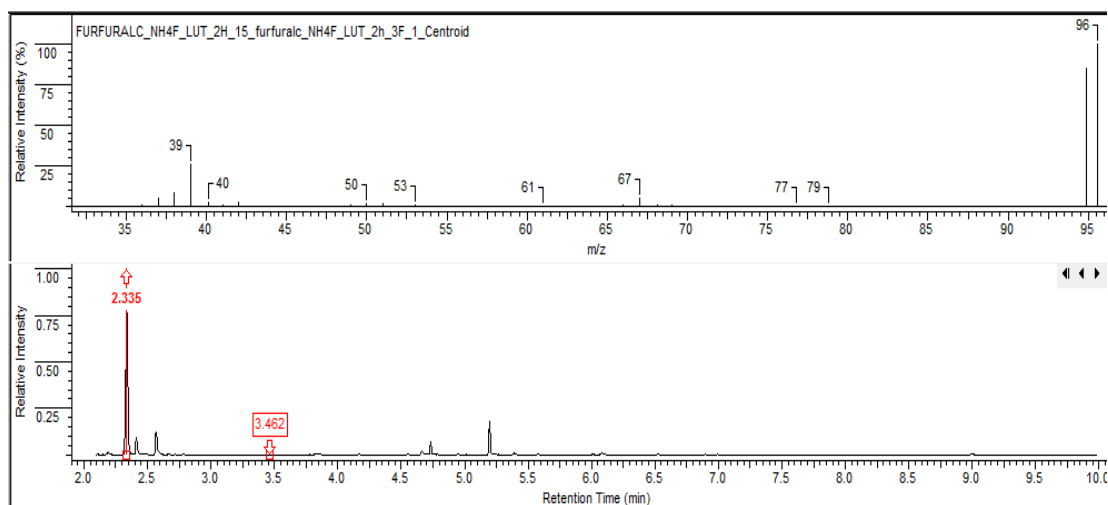


Рисунок 1 - Хромато-масс-спектр окисления фурфурилового спирта (2 ч)

Среди алифатических спиртов наилучший выход показал октанол-1, так как процент нитрилов составил 44 % через два часа синтеза, и 56 % после четырёх часов. Также неплохие результаты оказались у нонанола-1, где образовалось 35 % продукта через два часа и 38 % спустя четыре часа синтеза [4]. Наименее эффективными к окислению среди алифатических спиртов были гексанол-1 и гептанол-1, так, гептанол-1 через два часа эксперимента образовал всего 26 % нитрилов, в то время как гексанол-1 - 29 %, однако C_7 через четыре часа получил 35 % продукта, в то время как C_6 только 30 %.

Выводы. Таким образом, показано применение метода газовой хромато-масс-спектрометрии в анализе продуктов химического окисления спиртов до нитрилов. Также была разработана методика химического окисления спиртов до нитрилов, при последующей обработке результатов методом ГХ-МС.

Список литературы

1. Газовая хроматография будущего: колонки, время которых пришло / В.Н. Сидельников, О.А. Николаева, И.А. Платонов, В.Н. Пармон // Успехи химии. 2016. № 85(10). С. 1033-1055.
2. Исследование влияния гомологов пиридина на электрохимическое окисление спиртов / Е.С. Краснобрыжая, Е.Н. Шубина, И.Ю. Жукова и др. // Молодой исследователь Дона. 2019. № 4(19). С. 2-6.
3. Каталитическая система на основе $tempo/i2$ для селективного окисления спиртов / Е.Н. Шубина, М.А. Алексеев, Е.В. Голубенко и др. // Молодой исследователь Дона. 2020. № 2(23). С. 79-84.

АНОСОВА Л.С., АГАФОНОВ А.М.
**ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАПРОКСЕНА И
ПАРАЦЕТАМОЛА МЕТОДОМ ГЖ-МС В КОМБИНИРОВАННЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ**

*Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького,
г. Донецк
e-mail: apteka-NaNya@yandex.ru*

ANOSOVA L.S., AGAFONOV A.M.
**CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF NAPROXEN AND
PARACETAMOL BY GJ-MS IN COMBINED DRUGS**

*Donetsk National Medical University after M. Gorky, Donetsk
e-mail: apteka-NaNya@yandex.ru*

Аннотация. В статье рассматривается определение напроксена и парацетамола в биологических жидкостях организма методом газожидкостной хроматографии с масс-детектированием. Проведен анализ без дериватизации и с дериватизацией. Проанализированы кислое и щелочное хлороформное извлечение на содержание метаболитов и нативных веществ напроксена и парацетамола в случаях употребления комбинированных лекарственных препаратов, таких как спазмалгон эффект, пенталгин.

Abstract. The article discusses the determination of naproxen and paracetamol in body fluids by gas-liquid chromatography with mass detection. The analysis was carried out without derivatization and with derivatization. Acid and alkaline chloroform extraction was analyzed for the content of metabolites and native substances of naproxen and paracetamol in cases of use of combined drugs, such as spasmalgon effect, pentalgin.

Ключевые слова. Парацетамол, напроксен, нативные вещества, метаболиты, химико-токсикологический анализ.

Keywords. Paracetamol, naproxen, native substances, metabolites, chemical and toxicological analysis.

В настоящее время по частоте применения нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) занимают одно из первых. НПВС выпускаются в таких лекарственных формах: в таблетках, мазях, суппозиториях, растворов для парентерального введения. Такое широкое применение данной группы препаратов обусловлено тем, что это ОТС-препараты, т.е. безрецептурные, которые обладают разным фармакологическим действием и широко используются при болях разной этиологии. На фармацевтическом рынке популярностью стали пользоваться комбинированные лекарственные препараты, которые кроме НПВС

содержат и другие группы препаратов для получения более широкого фармакологического эффекта [11].

Напроксен и парацетамол — это безрецептурные НПВП, которые используются для лечения боли, воспаления и лихорадки у людей и животных. Напроксен представляет собой (S)-6-Метокси-альфа-метил-2-нафталинуксусная кислота. Парацетамол представляет собой N-(4-Гидроксифенил)ацетамид.

Данных по отравлению людей напроксеном не обнаружено только потому, что нет методик определения метаболитов и нативного вещества в биожидкостях и биоматериале. Но есть данные об отравлении животных.

В Центре по борьбе с отравлениями животных в 2001–2011 годах было зарегистрировано 4404 случая отравления напроксеном, как от напроксена, который был прописан собакам, так и от случайной передозировки лекарствами [9].

Разовые дозы напроксена, не превышающие 7 мг на кг, могут иметь значительные симптомы, в то время как 13–15 мг на кг вызовут признаки почечной недостаточности с повышенным содержанием азота в крови [3].

По данным регистра исследовательской группы, на отравление парацетамолом приходится почти 50% всех случаев острой почечной недостаточности (ОПН) в США и Великобритании [6, 10]. В США передозировка парацетамолом является основной причиной обращения в токсикологические центры (до 100000 в год), более 56000 вызовов неотложной помощи, 26000 госпитализаций и ежегодной причиной почти 450 летальных исходов в результате ОПН [4, 5, 7].

Газовая хроматография является одним из экспрессных методов физико-химического анализа, который в судебно-химической практике используется для идентификации и количественного определения ксенобиотиков, ставших причиной летальных и острых отравлений, характеризуется высокой чувствительностью и позволяет выявлять «следовые» количества веществ – до 10^{-8} % [8].

Поскольку лекарственные препараты подвергаются в организме человека интенсивной биотрансформации, для обнаружения фактов его потребления необходимы данные об основных метаболитах. Для подтверждения факта приема и определение степени воздействия препарата на организм, необходимо количественное определение всех составляющих комбинированного препарата в биожидкостях [1].

Целью работы явилась разработка метода изолирования и проведение идентификации в биологической жидкости (интактная моча человека) лекарственных субстанций напроксена и парацетамола методом газовой хроматографией с масс-селективным детектором (ГХ-МС) в комбинированных препаратах.

В качестве **объектов исследования** были выбраны лекарственные субстанции, которые входят в комбинированный лекарственный препарат

(спазмалгон эффект, пенталгин): напроксен [(S)-6-Метокси-альфа-метил-2-нафталинуксусная кислота] [3] и парацетамол N-(4-Гидроксифенил)ацетамид [5].

Условия ГХ-МС-анализа: хроматограф Agilent 6890 N, мас-детектор Agilent 5975; колонка капиллярная Agilent HP 1- неподвижная фаза метилсилоксан (30 м×0,25 мм, 0,25 мкм); газ-носитель – гелий, скорость потока – 1,0 мл/мин; начальная температура колонки 70 °С-1,00 мин, следующее повышение со скоростью 15°С/мин до 295°С/мин, изотермический режим (295 °С) – 4 мин; температура инжектора – 250 °С, температура источника излучения и квадруполя масс-детектора устанавливались на уровне 230°С и 150°С, соответственно, объем введенной пробы-1 мкл; масс-детекция проводится при электронной ионизации 70 eV, а сканирование проводилось в режиме SCAN, в диапазоне 45 - 550 атомных единиц массы (m/z).

Управление данным производилось согласно программного обеспечения Agilent ChemStation (версия E.01.01.335). Напроксен и парацетамол в пробах идентифицировали по времени удерживания и масс-спектрам [1, 2].

Предварительно проводили щелочной и кислотный гидролиз. После кислотного гидролиза обнаружен метаболит и продукт гидролиза парацетамола – n-аминофенол.

В связи с образованием конъюгатов анализируемых веществ, при анализе мочи, стадии изолирования предшествует стадия *кислотного гидролиза* для их разрушения. К 3 мл мочи с исследуемыми веществами прибавляли 3 мл дихлорметана и кислоту хлористоводородную, концентрированную для разрушения конъюгатов до pH =2-3 (по индикаторной бумаге), нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После кипячения добавляли дихлорметан и изменяли pH среды посредством добавления гидроксида аммония до pH =9 (по индикаторной бумаге). Охлаждали, центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 10 мин и отделяли водную фазу. Полученное извлечение переносили в выпарительную чашу и выпаривали до сухого остатка. Проводили дериватизацию 3-фторацилированием. К сухому остатку добавляли 70 мкл 3-фторуксусного ангидрида. Термостатирование проводили 60 мин при температуре 60°С. Реактив упаривали до сухого остатка и реконструировали в 100 мкл этилацетата. Вводили пробу в прибор в объеме 0,2 мкл.

При определении щелочного извлечения методом ГХ-МС использовали метод *пробоподготовки* – силирование с BSTFA. К исследуемому объекту, помещенному в виалу, прибавляли 50 мкл смеси 25%-ного раствора BSTFA в ацетонитриле. Смесь термостатировали при 90 °С в течение 20 мин, затем упаривали до сухого остатка. Растворяли в 100

мкл этилацетата и вводили 0,2 мкл в испаритель газового хроматографа и проводили исследование методом ГХ-МС.

Результаты исследования и их обсуждения. При ГХ/МС исследовании извлечения из мочи после кислотного и щелочного гидролиза и обработки дериватизирующими агентами был получен спектры. Регистрация масс-спектров триметилсилильных производных в режиме полного ионного тока в интервале 45-550 а.е.м.

Характерные ионы в масс-спектрах исследуемых веществ.
Кислотное извлечение. В кислотном извлечении был обнаружен метаболит и продукт гидролиза парацетамола – *p*-аминофенол.

p-Аминофенол-2TFA - время удерживания 6,9 мин., молекулярная масса 301,0, *m/z*- 301*, 204, 69, 109, 176, 232,134 (* Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала).

Щелочное извлечение. После щелочного гидролиза и силирования обнаружены дериваты напроксена – напроксен-TMS и *O*-дезметилнапроксен-2TMS, и парацетамола - парацетамол-2TMS и парацетамол *O*-TMS.

Напроксен-TMS – время удерживания 12,73 мин., Молекулярная масса 302,0, *m/z* - 185, 243, 302*,287, 73.141, 115, 212, 85 (* Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала).

O-Дезметилнапроксен-2TMS – время удерживания 13,23 мин., молекулярная масса 360,0, *m/z* - 243,360*,73,345, 152,316 (* Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала).

Парацетамол-2TMS – время удерживания 9,71 мин., молекулярная масса 295,0, *m/z*- 206, 280,295*, 116, 237, 165, 63 (* Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала).

Парацетамол-O-TMS – время удерживания 10,39 мин., молекулярная масса 223,0, *m/z*- 181,223*,166, 208,106,65 (* Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала).

При ГХ/МС исследовании щелочного извлечения из мочи без последующей обработки дериватизирующими агентами был получен спектр нативных соединений, но напроксена обнаружено не было.

При ГХ/МС исследовании щелочного извлечения из мочи идентифицированы пики *парацетамола* – время удерживания 7,48 мин., молекулярная масса 151,0, *m/z*- 109, 80,151*,53,130 (*Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала) и его продукта гидролиза *p*-аминофенола – время удерживания 6,39 мин., молекулярная масса 109,0, *m/z*- 109*,80, 53 (*Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала)

Вывод. Таким образом, изучена методика анализа веществ, входящих в состав комбинированных препаратов, содержащих напроксен и парацетамол, и их метаболитов в биологических объектах методом газовой хроматографии-масс спектрометрии (ГХ-МС) с предварительной

дериватизацией и без нее. Доказано, что без дериватизации, обнаружить напроксен и его следы в биологической жидкости невозможно.

Список литературы

1. Аносова Л.С., Агафонов А.М. Химико-токсикологический анализ комбинированных препаратов методом ГХ-МС // International Scientific Conference on Medical Sciences "The concept of modern pharmacy and medicine in Ukraine and the EU countries". Włocławek, Poland, 2021. С. 184-196.
2. Вергун О.М., Борисевич С.Н., Камышников В.С. Острые отравления парацетамолом, диагностика // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. №2 (14), 2015. С. 113-118.
3. Davis N.M., Anderson K.E.: Clinical pharmacokinetics of naproxen. Clinical pharmacokinetics. 2007. April; 32 (4): 268-293
4. Fagan E., Wannan G. Reducing paracetamol overdoses // BMJ. 2006. Vol. 313. № 7070. P. 1417–1418.
5. Larson A.M., Polson J., Fontana R.J. et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study // Hepatology. 2005. Vol. 42. № 6. P. 1364–1372.
6. Lee W.M. Acute liver failure // Semin. Respir. Crit. Care Med. 2012. Vol. 33. № 1. P. 36–45.
7. Litovitz T.L., Klein-Schwartz W., White S. et al. 1999 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System // Am. J. Emerg. Med. 2000. Vol. 18. № 5. P. 517–574.
8. Meyer, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. – 5th ed. – New York: Wiley-VCH, 2010. – 426 p.
9. Naproxen Poisoning in Dogs - Symptoms, Causes, Diagnosis, Treatment, Recovery, Management, Cost. // <https://wagwalking.com/condition/naproxen-poisoning> (дата доступа 29.09.2021)
10. Polson J., Lee W.M., American Association for the Study of Liver Disease. AASLD position paper: the management of acute liver failure // Hepatology. 2005. Vol. 41. № 5. P. 1179–1197.
11. Химико-токсикологическое исследование некоторых нестероидных противовоспалительных средств. Ваталев А.А., Киреева А.В., Куклин В.Н. *Бутлеровские сообщения*. 2014. Т.39. №7. С.108-116.

^{1,2}БАТАШЕВ С.А., ¹СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., ²ДЕМЕРЛИЙ А.М.
**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕАКЦИОННОЙ МАССЫ
МЕТОКСИКАРБОНИЛИРОВАНИЯ ЦИКЛОГЕКСЕНА
В ПРИСУТСТВИИ RuCl₃**

¹*Тульский государственный педагогический университет
им. Л.Н. Толстого, г. Тула*

²*ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», г. Тула
e-mail: tulapharma@gmail.com*

^{1,2}BATASHEV S.A., ¹SEVOSTYANOVA N.T., ²DEMERLII A.M.
**CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THE REACTION MASS OF
THE CYCLOHEXENE METHOXYCARBONYLATION
IN THE PRESENCE OF RuCl₃**

Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula

²*ООО «Tul'skaya farmatsevticheskaya fabrika», Tula
e-mail: tulapharma@gmail.com*

Аннотация: Метод газо-жидкостной хроматографии в сочетании с масс-селективным детектором применялся для идентификации побочных продуктов метоксикарбонилирования циклогексена, катализируемого RuCl₃. Хромато-масс-спектрометрические исследования, дополненные кинетическими данными о реакции, были использованы для установления механизма сложной многомаршрутной реакции.

Abstract: The gas-liquid chromatography method in combination with a mass-selective detector was used to identify the by-products of the cyclohexene methoxycarbonylation catalyzed by RuCl₃. Chromato-mass spectrometric studies supplemented with kinetic data on the reaction were used to establish the mechanism of a complicated multi-route reaction.

Ключевые слова: Газо-жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, метилциклогексанкарбоксилат, метоксикарбонилирование, 1-метоксициклогексан, циклогексилметанол, диметоксиметан.

Keywords: Gas-liquid chromatography, chromato-mass spectrometry, methyl cyclohexanecarboxylate, methoxycarbonylation, 1-methoxycyclohexane, cyclohexylmethanol, dimethoxymethane.

Цель исследования. Метоксикарбонилирование циклогексена метанолом и СО приводит к образованию метилового эфира циклогексанкарбоновой кислоты – потенциального полупродукта в синтезе фармацевтических препаратов [1]. Традиционно в алкоксикарбонилировании ненасыщенных соединений применяются гомогенные каталитические системы, включающие соединение Pd, органофосфиновый промотор и кислоту-сокатализатор. Такие системы отличаются высокой ценой не только в связи с применением соединений Pd,

но и дорогостоящих органофосфинов. Добавление сильных Н-кислот создает коррозионно активную среду, что нежелательно для промышленно ориентированных процессов, поскольку ведет к быстрому износу стального оборудования и удорожанию продуктов. Нами были предложены новые гомогенные катализаторы метоксикарбонилирования циклогексена – RuCl_3 и система $\text{RuCl}_3\text{-NaCl}$ [2-4]. Однако процесс осложнялся образованием побочных продуктов. В этой связи цель работы – идентификация побочных продуктов метоксикарбонилирования циклогексена при катализе RuCl_3 методом хромато-масс-спектрометрии.

Материалы и методы исследования. Для идентификации органических соединений в настоящее время наиболее часто применяются методы ИК-, ЯМР-спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии. Особенностью идентификации в нашем случае является сложный состав реакционной массы, основным компонентом которой являлся метанол (сореагент и среда для метоксикарбонилирования). В реакционной массе помимо трех побочных продуктов, подлежащих идентификации, также присутствуют основной продукт (метилциклогексанкарбоксилат), сореагент циклогексен, и каталитическая система. Применение методов ИК- и ЯМР-спектроскопии требует извлечения продуктов из многокомпонентной системы. В данном случае эта проблема осложняется тем, что побочные продукты образовались в малых количествах. Кроме того, для их извлечения желательнее использование вакуумной перегонки. В этой связи был выбран метод ГЖХ с масс-селективным детектором. Этот метод совмещает возможности разделения сложной смеси на индивидуальные компоненты и последующую масс-спектрометрическую идентификацию.

Хромато-масс-спектрометрия реакционной массы выполнялась с использованием аппаратно-программного комплекса на базе газового хроматографа "Кристалл 5000.1" с масс-спектрометрическим детектором TRACE DSQ и кварцевой капиллярной колонкой (длина 30 метров, внутренний диаметр 0,25 мм, неподвижная жидкая фаза – 5% фенилполисилоксан TR-5MS, толщина пленки 0,25 мкм) при следующих заданных условиях [3]:

- температура инжектора 280 °С;
- программирование температуры термостата колонки в диапазоне 100-280°С со скоростью нагрева 8 °С/мин;
- газ-носитель - гелий особо чистый, скорость потока – 1,0 мл/мин.;
- время анализа – 28 мин;
- деление потока 1:8;
- масс-селективный детектор в режиме электронного удара (70 эВ);
- температура источника ионов 200 °С;
- температура интерфейса 250 °С;
- заданный диапазон атомных единиц масс (а.е.м.) 42-560.

Для идентификации продуктов использовалась электронная библиотека спектров NIST MS Search 2.0.

Результаты исследования и их обсуждение.

Побочный продукт 1 (1-метоксициклогексан, $C_6H_{11}OCH_3$), m/z : 58, 71, 71, 114, and 115.

Побочный продукт 2 (циклогексилметанол, $C_6H_{11}CH_2OH$), m/z : 51, 54, 55, 67, 81, 83, 96, 131, 147, 203, 237, 282, 295, 315, 355, 391, 464, 493, 549, 577, and 612.

Побочный продукт 3 (диметоксиметан, $CH_3OCH_2OCH_3$), m/z : 54, 55, 75, 95, 127, 128, 191, 213, 275, 330, 346, 394, 443, 480, 501, 538, 585, 609, and 633.

Примечательно, что все побочные продукты включают фрагменты метанола. Как известно, в реакциях с несколькими продуктами, как правило, образование основного и побочных продуктов происходит по одним и тем же маршрутам через одни и те же интермедиаты. На основании результатов хромато-масс-спектрометрии в сочетании с данными кинетических исследований реакции было выдвинуто предположение об алкоголятном механизме метоксикарбонилирования циклогексена [3] в противоположность гидридному механизму. На основании схемееалкоголятного механизма было получено кинетическое уравнение реакции и кинетическая модель, работающая на всем протяжении реакции [2, 4].

Выводы.

1. Хромато-масс-спектрометрия с использованием электронной библиотеки спектров обеспечивает необходимую правильность и возможность быстрой и удобной идентификации продуктов.

2. Газовая хроматография в сочетании с методом масс-спектрометрии позволяет проводить идентификацию органических продуктов без их предварительного выделения из сложных многокомпонентных смесей.

3. Хромато-масс-спектрометрические данные, дополненные информацией о кинетике реакции, могут применяться как удобный инструмент для установления механизма сложной многомаршрутной реакции.

Список литературы

1. Лapidус А. Л., Пирожков С. Д. Каталитический синтез органических соединений карбонилированием непредельных углеводов и спиртов // Успехи химии. 1989. Т. 58. Вып. 2. С. 197-233.

2. Севостьянова Н. Т., Баташев С. А. Кинетическая модель гидрометоксикарбонилирования циклогексена, катализируемого $RuCl_3$ // Известия Академии наук. Серия химическая. 2019. N 3. С. 540-546.

3. Sevostyanova N., Batashev S. Cyclohexene hydrocarbomethoxylation catalyzed by ruthenium (III) chloride // Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis, 2017. V. 122. Iss. 1. P. 315-331.

4. Sevostyanova N., Batashev S. Kinetic equations and models of cyclohexene hydrocarbomethoxylation catalyzed by RuCl_3 and $\text{RuCl}_3/\text{NaCl}$ system // Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis. 2018. V. 125. N. 2. P. 505-520.

БАТАШЕВ С.А., СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т.
**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ОПРЕДЕЛЕНИИ
ЧИСТОТЫ 2-ХЛОР-4-НИТРОАНИЛИНА**

*Тульский государственный педагогический университет
им. Л.Н. Толстого, г. Тула
e-mail: tulapharma@gmail.com*

BATASHEV S.A., SEVOSTYANOVA N.T.
**CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS IN DETERMINING OF
2-CHLORO-4-NITROANILINE PURITY**

*Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula
e-mail: tulapharma@gmail.com*

Аннотация: Разработана методика определения органических примесей в 2-хлор-4-нитроанилине методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. Идентификация примесей осуществлялась по времени их удерживания неподвижной фазой.

Abstract: A method for determining of organic impurities in 2-chloro-4-nitroaniline by gas-liquid chromatography with a flame ionization detector has been developed. The impurities identification was carried out by the time of their retention by the stationary phase.

Ключевые слова: Газо-жидкостная хроматография, пламенно-ионизационный детектор, 2-хлор-4-нитроанилин, основное вещество, примесь.

Keywords: Gas-liquid chromatography, flame ionization detector, 2-chloro-4-nitroaniline, basic substance, impurity.

Цель исследования. 2-Хлор-4-нитроанилин – ценный химический продукт, применяющийся в производстве протравных, дисперсных, катионных красителей, пигментов, лекарственных средств (в частности, фенасала) и 2-хлор-1,4-фенилендиамина [1]. В связи с разнообразием областей применения возникает необходимость точного, удобного и по возможности быстрого анализа 2-хлор-4-нитроанилина на содержание

примесей, что определило цель работы – разработку методики анализа этого продукта методом газо-жидкостной хроматографии.

Материалы и методы исследования. Метод основан на хроматографическом разделении основного вещества и примесей, содержащихся в образце 2-хлор-4-нитроанилина, с последующем их детектировании пламенно-ионизационным детектором. Количественное определение идентифицированных компонентов образца пробы проводили методом абсолютной градуировки.

Для работы использовался газовый хроматограф Кристаллюкс-4000М с пламенно-ионизационным детектором. Разделение веществ осуществлялось в кварцевой колонке длиной 30 м, диаметром 0,32 мм с нанесенной пленкой фенилметилполисилоксана толщиной 0,25 мкм. Измерения выполняли при следующих режимных параметрах хроматографа:

- газ-носитель – Ar, объемный расход 1 см³/мин.;
- объемный расход водорода 30 см³/мин., воздуха – 250 см³/мин.;
- деление потока 1:50;
- поддув газа-носителя в детектор 30 см³/мин.;
- температура инжектора 280 °С;
- температура детектора 300 °С;
- температура колонки: с 0 по 8,33 мин. – программирование температуры от 150 до 200 °С; с 8,33 по 13,33 мин. – изотерма 200 °С; с 13,33 по 16 мин. – программирование температуры от 200 до 240 °С; с 16 по 25 мин. – изотерма 240 °С.

Объем вводимой пробы составлял 1,0 мкл, время хроматографирования раствора пробы – 25 мин.

Для регистрации аналитического сигнала и расчетов использовали программное обеспечение NetChrom v.2.1

В работе применялись следующие реактивы: бензол по ГОСТ 5955-75, х.ч.; 2-хлор-4-нитроанилин (порошок ярко-желтого цвета, Т.пл. 107-109 °С); 2,6-дихлор-4-нитроанилин (CAS 99-30-9, порошок ярко-зеленовато-желтого до зеленовато-желтого или желтого цвета, Т.пл. 190-192 °С); 1,2-дихлор-4-нитробензол (CAS 99-54-7, кристаллы от белого до светло-желтого или светло-коричневого цвета, Т.пл. 39-41 °С); 4-нитроанилин (CAS 100-01-6, порошок или мелкокристаллический порошок от желтого до золотистого или коричневого цвета, Т.пл. 146-149 °С); 1-хлор-4-нитробензол (CAS 100-00-5, кристаллы или мелкокристаллический порошок от желтого до желто-зеленого цвета, Т.пл. 80-83 °С); 1,2,3-трихлор-5-нитробензол (CAS 20098-48-0, порошок или кристаллы от белого до желтого, от бледно-оранжевого до оранжевого, от бледно бежевого до бежевого или бледно коричневого до коричневого цвета, Т.пл. 68-71 °С).

Хроматограф градуировали по пяти искусственным смесям методом абсолютной градуировки. Для этого был приготовлен стандартный раствор

№1, содержащий стандартные образцы наиболее часто встречающихся примесей 2-хлор-4-нитроанилина: 2,6-дихлор-4-нитроанилин, 1,2-дихлор-4-нитробензол, 1-хлор-4-нитробензол, 4-нитроанилин и 1,2,3-трихлор-5-нитробензол. Раствор №1 в дальнейшем разбавляли бензолом с получением еще четырех стандартных растворов, которые использовали для получения градуировочной прямой. Измерение каждого градуировочного раствора выполняли не менее 3-х раз.

Раствор исследуемого образца 2-хлор-4-нитроанилина готовили путем растворения его точной навески в бензоле. Полученный раствор хроматографировали не менее 3 раз.

Результаты исследования и их обсуждение. На основании данных по градуировке были определены концентрации (г/см^3) каждой идентифицируемой примеси в растворе исследуемой пробы 2-хлор-4-нитроанилина для каждого измерения и на их основе – средняя величина концентрации каждой идентифицируемой примеси (\bar{C}_i , % мас.). При этом относительная стандартная погрешность, рассчитанная для параллельных определений концентрации индивидуальной примеси, не превышала 5,0%.

Содержание каждого из неидентифицируемых компонентов в пробе (X_i) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \times 100\%,$$

где: S_i – площадь пика i -ого не идентифицированного компонента на хроматограмме раствора образца пробы, мВ*мин;

$\sum S_i$ – сумма площадей пиков всех компонентов за исключением пиков, относящихся к растворителю, на хроматограмме раствора образца пробы, мВ*мин.

Содержание 2-хлор-4-нитроанилина в пробе (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = 100\% - \sum X_i,$$

где: $\sum X_i$ – сумма концентраций i -ых идентифицируемых примесей и неидентифицируемых компонентов, рассчитанных для раствора образца пробы, %.

Пригодность разработанной методики была подтверждена тестами по относительным стандартным погрешностям, рассчитанным для площадей пиков идентифицированных примесей (не превышали 5,0 %) и числу теоретических тарелок.

Выводы.

1. Установлено, что метод газо-жидкостной хроматографии с применением пламенно-ионизационного детектора применим для определения идентифицируемых и неидентифицируемых органических примесей в 2-хлор-4-нитроанилине.

2. В условиях анализа пики основного продукта и пяти основных идентифицируемых примесей удовлетворительно разделялись.

3. Длительность анализа составляет 25 мин., что делает разработанную методику удобной для применения.

Список литературы

1. Химический энциклопедический словарь / Гл. ред. И. Л. Кнунянц. М.: Советская энциклопедия, 1983. 792 с.

БАТАШЕВ С.А., СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т.
МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСИ 2,6-ДИНИТРОАНИЛИНА В 2,4-ДИНИТРОАНИЛИНЕ МЕТОДОМ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

*Тулский государственный педагогический университет
им. Л.Н. Толстого, г. Тула
e-mail: tulapharma@gmail.com*

BATASHEV S.A., SEVOSTYANOVA N.T.
METHOD FOR DETERMINING THE 2,6-DINITROANILINE IMPURITY IN 2,4-DINITROANILINE BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

*Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula
e-mail: tulapharma@gmail.com*

Аннотация: Разработана методика определения примеси 2,6-динитроанилина в 2,4-динитроанилине методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. Методика рекомендуется для использования в научно-исследовательских работах при анализе образцов 2,4-динитроанилина с содержанием примеси 2,6-динитроанилина не менее 0,015 %.

Abstract: A method for determining the 2,6-dinitroaniline impurity in 2,4-dinitroaniline by gas-liquid chromatography with a flame ionization detector has been developed. The technique is recommended for use in scientific research when analyzing samples of 2,4-dinitroaniline with the 2,6-dinitroaniline impurity content of at least 0.015%.

Ключевые слова: Газо-жидкостная хроматография, пламенно-ионизационный детектор, 2,4-динитроанилин, 2,6-динитроанилин, тетрагидрофуран, основное вещество, примесь, метод абсолютной градуировки, относительная стандартная погрешность, число теоретических тарелок.

Keywords: Gas-liquid chromatography, flame ionization detector, 2,4-dinitroaniline, 2,6-dinitroaniline, tetrahydrofuran, basic substance, impurity, absolute calibration method, relative standard error, number of theoretical plates.

Цель исследования. 2,4-Динитроанилин применяется в производстве дисперсных красителей и азокрасителей, красителей для меха, пигментов, 4-нитро-1,3-фенилендиамина, 2-хлор-4,6-динитроанилина, 2-бром-4,6-динитроанилина, является ингибитором коррозии [1]. Может применяться также в производстве полимеров. В связи с разнообразием областей применения этого продукта возникает необходимость определения его чистоты. Следует учесть, что 2,4-динитроанилин не растворим в холодной воде, трудно растворим в горячей воде, соляной кислоте, спиртах, взрывается при ударе, самовоспламеняется при 461 °С, способен вызывать дерматиты [1]. Поэтому для его анализа непригодны методы, применяемые в анализе водных растворов. В разработанных методиках анализа должны, по возможности, требоваться небольшие количества вещества. Способ получения 2,4-динитроанилина основан на аминировании 1-хлор-2,4-динитробензола [1]. Основной примесью 2,4-динитроанилина является 2,6-динитроанилин. В этой связи цель данной работы – разработка методики определения примеси 2,6-динитроанилина в 2,4-динитроанилине. При этом важной задачей является выбор подходящего растворителя.

Материалы и методы исследования. Метод основан на хроматографическом разделении 2,6- и 2,4-динитроанилинов с последующим их детектированием пламенно-ионизационным детектором.

Количественное определение веществ проводили методом абсолютной градуировки. Следует отметить, что основное вещество и определяемая примесь имеют один и тот же поправочный коэффициент для пересчета площади хроматографического пика в концентрацию, поскольку чувствительность детектора одинакова к веществам-изомерам.

Для работы использовался газовый хроматограф Кристаллюкс- 4000М с пламенно-ионизационным детектором. Разделение веществ осуществлялось в кварцевой колонке длиной 30 м, диаметром 0,32 мм с нанесенной пленкой фенилметилполисилоксана толщиной 0,25 мкм. Измерения выполняли при следующих режимных параметрах хроматографа:

- газ-носитель – Ar, объемный расход 1 см³/мин.;
- объемный расход водорода 30 см³/мин., воздуха – 250 см³/мин.;
- деление потока 1:50;
- поддув газа-носителя в детектор 30 см³/мин.;
- температура инжектора 280 °С;
- температура детектора 300 °С;
- температура колонки: с 0 по 25 мин. – программирование температуры от 150 до 270 °С; с 25 по 30 мин. – изотерма 270 °С.

Объем вводимой пробы составлял 1,0 мкл, время хроматографирования градуировочных растворов – 15 мин., раствора анализируемого образца 2,4-динитроанилина – 30 мин.

Для регистрации аналитического сигнала и расчетов использовали программное обеспечение NetChrom v.2.1

В работе применялись следующие реактивы: тетрагидрофуран имп., квалификации для хроматографии; 2,6-динитроанилин (твердое вещество коричнево-желтого цвета, плавится при 134 °С с разложением); 2,4-динитроанилин (порошок или чешуйки от желтого до темно-жёлтого или от оранжевого до темно-оранжевого или от коричневого до темно-коричневого цвета, температура плавления 176-178 °С).

Для градуировки хроматографа методом абсолютной градуировки использовали шесть искусственных смесей. Для этого был приготовлен стандартный раствор №1 2,6-динитроанилина в тетрагидрофуране. Этот раствор в дальнейшем разбавляли тетрагидрофураном с получением пяти стандартных растворов, которые использовали для получения градуировочной прямой. Измерение каждой искусственной смеси выполняли не менее трех раз.

Раствор исследуемого образца 2,4-динитроанилина готовили растворением его точной навески в тетрагидрофуране. Полученный раствор хроматографировали не менее 3 раз.

Результаты исследования и их обсуждение. На основании данных по градуировочным растворам была определена концентрация (г/см³) 2,6-динитроанилина для каждого измерения и на их основе – средняя величина концентрации этого компонента (C_i , % мас.). При этом относительная стандартная погрешность, рассчитанная для параллельных определений концентрации 2,6-динитроанилина, не превышала 5,0%.

Хроматографическая система может считаться пригодной для количественного определения примеси 2,6-динитроанилина в 2,4-динитроанилине, если:

- 1) относительная стандартная погрешность, рассчитанная для площади пика 2,6-динитроанилина в каждом градуировочном растворе, не превышает 5,0%;
- 2) число теоретических тарелок для пика 2,6-динитроанилина составляет не менее 100 000;
- 3) отношение сигнал/шум на хроматограммах градуировочных растворов с наименьшей концентрацией 2,6-динитроанилина составляет не менее 8.

Разработанная методика рекомендуется для определения содержания примеси 2,6-динитроанилина не менее 0,015 % в образце 2,4-динитроанилина при проведении научно-исследовательских работ.

Выводы. Установлено, что метод газо-жидкостной хроматографии с применением пламенно-ионизационного детектора применим для определения примеси 2,6-динитроанилина в 2,4-динитроанилине.

В условиях анализа пики основного продукта и примеси удовлетворительно разделялись.

Длительность анализа составляет 15 мин. для градуировочных растворов и 30 мин. для исследуемых образцов 2,4-динитроанилина, что делает разработанную методику удобной для применения.

Список литературы

1. Химический энциклопедический словарь / Гл. ред. И. Л. Кнунянц. М.: Советская энциклопедия, 1983. 792 с.

¹ДЕМЕРЛИЙ А.М., ²СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., ^{1,2}БАТАШЕВ С.А.
**ХРОМАТОГРАФИЯ В ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОДУКТОВ
МЕТОКСИКАРБОНИЛИРОВАНИЯ ОКТЕНА-1**

¹ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», г. Тула

²Тульский государственный педагогический университет

им. Л.Н. Толстого, г. Тула

e-mail: pilgrim.tula.ru@gmail.com

¹DEMERLII A.M., ²SEVOSTYANOVA N.T., ^{1,2}BATASHEV S.A.
**CHROMATOGRAPHY IN IDENTIFICATION OF
OCTENE-1 METHOXYCARBONYLATION PRODUCTS**

¹ООО «Tul'skaya pharmatsevticheskaya fabrika», Tula

²Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula

e-mail: pilgrim.tula.ru@gmail.com

Аннотация: при наличии стандартных образцов веществ идентификация продуктов в хроматографии проводится по времени удерживания определяемого вещества неподвижной фазой. Газо-жидкостная хроматография в сочетании с масс-селективным детектором использовалась для идентификации изомерных сложных эфиров разветвленного строения – побочных продуктов метоксикарбонилирования октена-1.

Abstract: In the presence of standard samples of substances, the identification of products in chromatography is carried out according to the retention time of the substance being determined by the stationary phase. Gas-liquid chromatography in combination with a mass-selective detector was used to identify isomeric esters of branched structure – by-products of octene-1 methoxycarbonylation.

Ключевые слова: Газо-жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, метоксикарбонилирование, метилпеларгонат, метиловый эфир 2-метилоктановой кислоты, метиловый эфир 2-этилгептановой кислоты.

Keywords: Gas-liquid chromatography, chromato-mass spectrometry, methoxycarbonylation, methyl pelargonate, methyl ester of 2-methyloctanoic acid, methyl ester of 2-methylheptanoic acid.

Цель исследования. Метоксикарбонилирование алкенов с незамещенной кратной связью спиртами и CO, как правило, приводит к образованию продуктов присоединения карбоксильной группы к обоим атомам углерода кратной связи. В присутствии гомогенных палладий-фосфиновых каталитических систем преимущественно образуются продукты линейного строения. Так, основным продуктом метоксикарбонилирования октена-1 являлся метилпеларгонат – потенциальный полупродукт в синтезе ванилиламида пеларгоновой кислоты (действующее вещество противоревматических лекарственных средств) [1-3]. Однако при хроматографическом анализе реакционной массы метоксикарбонилирования октена-1, катализируемого системами $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2 - \text{PPh}_3 - \text{TsOH}$ (п-толуолсульфо кислота) [1, 2] и $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 - \text{PPh}_3 - \text{TsOH}$ [3], было обнаружено три продукта. В этой связи целью работы стала идентификация продуктов метоксикарбонилирования октена-1 с применением хромато-масс-спектрометрии.

Материалы и методы исследования. Идентификация продуктов методами хроматографии может осуществляться по времени удерживания при наличии стандартных образцов веществ. В реакционной массе метоксикарбонилирования октена-1 основной продукт – метилпеларгонат (эфир *a*) – был идентифицирован этим способом. Для этого реакционную массу анализировали методом ГЖХ в тех же условиях, что и стандартный образец – товарный метилпеларгонат. Время выхода одного из продуктов метоксикарбонилирования октена-1 совпадало с временем выхода метилпеларгоната.

Для идентификации других неизвестных продуктов было необходимо выбрать наиболее приемлемый метод в связи с особенностью анализируемого объекта – реакционной массы сложного состава, содержащей толуол в качестве реакционной среды, сорреагенты октен-1 и метанол, а также гомогенную каталитическую систему. В этой связи был выбран метод ГЖХ с масс-селективным детектором. В отличие от других часто используемых методов идентификации органических соединений с помощью ИК- и ЯМР-спектроскопии хромато-масс-спектрометрия не требует предварительного выделения идентифицируемых продуктов в чистом виде, что существенно упрощает анализ и повышает его экспрессность. Метод хромато-масс-спектрометрии позволяет за

достаточно короткое время провести разделение компонентов смеси в хроматографической колонке и последующую их идентификацию с помощью масс-селективного детектора.

Анализ реакционной массы метоксикарбонилирования осуществляли методом ГЖХ на хроматографе «Цвет 160» с пламенно-ионизационным детектором и стеклянными колонками диаметром 3 мм, заполненными Хроматоном N-AW-DMCS, \varnothing 0,16÷0,2 мм с 15% REOPLEX 400 и 3% H_3PO_4 , при расходе газа-носителя (Ar) 30 мл/мин. Температура испарителя составляла 250 °С. Анализ проводили в режиме программирования температуры от 65 до 165°С при скорости подъема температуры 8°С/мин. [1-3].

Для хромато-масс-спектрометрической идентификации пиков неизвестных продуктов использовался аппаратно-программный комплекс на базе газового хроматографа "Кристалл 5000.1" с масс-спектрометрическим детектором TRACE DSQ с кварцевой капиллярной колонкой (длина 30 метров, внутренний диаметр 0,25 мм, неподвижная жидкая фаза - 5% фенилполисилоксан TR-5MS, толщина пленки 0,25 мкм) при следующих заданных условиях [3]:

- температура инжектора 280°С;
- программирование температуры термостата колонки в диапазоне 80-280°С со скоростью нагрева 10°С/мин;
- газ-носитель - гелий (особо чистый), скорость потока – 1,0 мл/мин.;
- время анализа – 28 мин.;
- деление потока 1:8;
- масс-селективный детектор в режиме электронного удара (70 эВ);
- температура источника ионов 200°С;
- температура интерфейса 250°С;
- заданный диапазон атомных единиц масс (а.е.м.) 42-450.

Идентификация продуктов осуществлялась с использованием электронной библиотеки спектров NIST MS Search 2.0.

Для работы использовались следующие реактивы: толуол по ГОСТ 5789-78, ч.д.а.; метанол по ГОСТ 2222-95; октен-1, 97,0% Sigma-Aldrich; метилпеларгонат, 98,0% Sigma-Aldrich; о-ксилол по ТУ 6-09-3825-88, для хроматографии (внутренний стандарт для количественных расчетов).

Результаты исследования и их обсуждение. Хроматограмма реакционной массы метоксикарбонилирования октена-1, полученная на хроматографе "Кристалл 5000.1", представлена на Рисунке. По результатам хромато-масс-спектрометрии эфир *a* – метилпеларгонат, эфир *b* – метиловый эфир 2-метилоктановой кислоты, эфир *c* – метиловый эфир 2-этилгептановой кислоты [3].

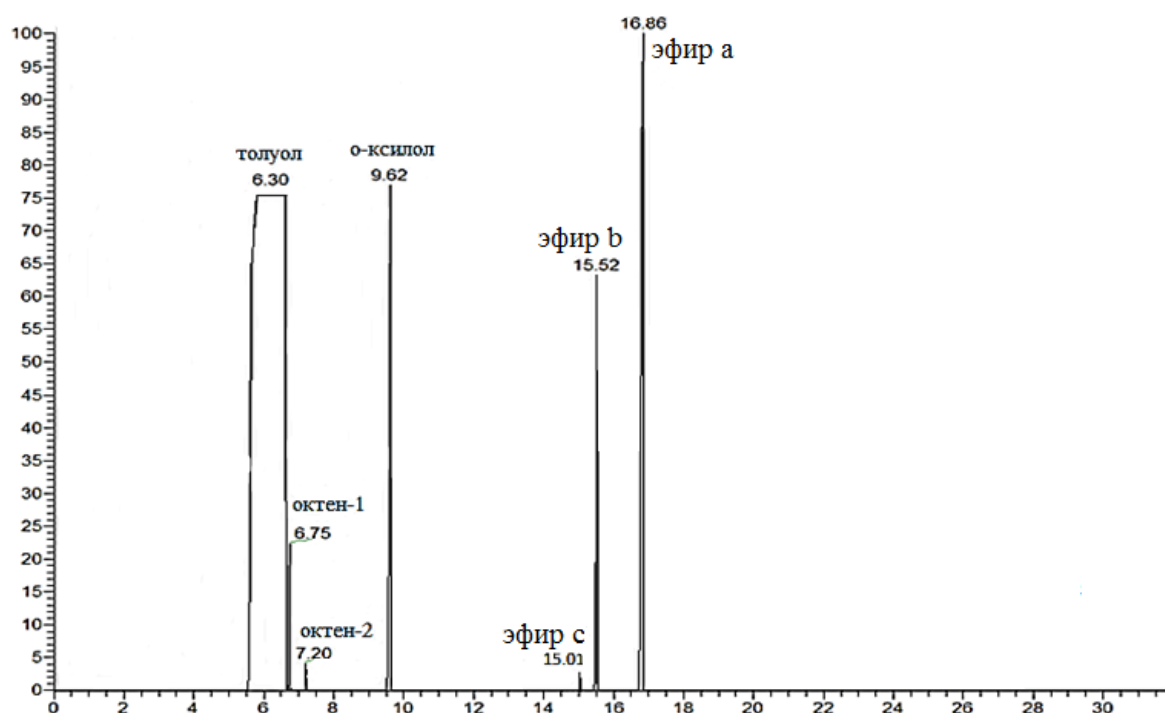


Рисунок. Хроматограмма реакционной массы метоксикарбонилирования октена-1, полученная на хроматографе "Кристалл 5000.1 [3].

Результаты хромото-масс-спектрометрической идентификации эфира *a* соответствуют данным, полученным при идентификации этого продукта по времени удерживания. Два неизвестных продукта оказались разветвленными сложными эфирами. Эфир *b* – продукт присоединения карбоксильной группы по второму атому углерода кратной связи октена-1. Образование эфира *c* – результат изомеризации терминальной кратной связи октена-1, в результате которой образуется октен-2, с последующим карбонилированием в направлении образования наименее разветвленного продукта. Следует отметить, что хромото-масс-спектрометрия реакционной массы показала присутствие в ней небольших количеств октена-2. Процесс изомеризации может ускоряться в присутствии сильных протонных кислот, в частности TsOH – компонента каталитических систем, применяемых в метоксикарбонилировании. Однако дальнейшая изомеризация кратной связи внутрь цепи октена, по-видимому, не происходит. По результатам проведенных кинетических исследований [1-3] было установлено, что при увеличении концентрации TsOH выход эфира *c* повышается, в то время как выход целевого продукта *a* снижается. Таким образом, установленное методом хромото-масс-спектрометрии образование продукта *c* согласуется с данными о кинетике и механизме исследуемой реакции.

Выводы.

1. Хромото-масс-спектрометрия с автоматической идентификацией продуктов по электронной библиотеке спектров демонстрирует необходимую правильность и возможность быстрой и удобной идентификации продуктов метоксикарбонилирования октена-1.

2. Газовая хроматография в сочетании с методом масс-спектрометрии позволила осуществить идентификацию изомерных сложных эфиров линейного и разветвленного строения без их предварительного выделения из многокомпонентной реакционной массы. Для этого не потребовались стандартные образцы труднодоступных сложных эфиров разветвленного строения.

3. Полученные хромато-масс-спектрометрические данные согласуются с общими представлениями о механизме алкоксикарбонилирования ненасыщенных соединений и составе образующихся продуктов.

Список литературы

1. Аверьянов В. А., Баташев С. А., Севостьянова Н. Т., Зарытовский В. М. Влияние условий на скорость и селективность гидрокарбметоксилирования октена-1, катализируемого фосфиновым комплексом палладия // Катализ в промышленности. 2005. N 2. С. 25-33.

2. Баташев С. А. Механизм и кинетические закономерности реакций гидрокарбалкоксилирования алкенов при катализе системой $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2 - \text{PPh}_3 - \text{p}$ -толуолсульфокислота: дис. ... канд. хим. наук. Тула, 2005. 134 с.

3. Демерлий А.М. Кинетические закономерности и моделирование реакций гидрокарбметоксилирования алкенов: дис. ... канд. хим. наук. Тула, 2016. 206 с.

¹ОСТРОВЕРХОВ П.В., ¹ЛОБАНОВ И.А., ¹АФАУНОВ А.А.,
¹МАРЦИНКЕВИЧ Е.М., ¹ХАСХАНОВА И.М., ²ВЛАСОВА К.Ю.,
^{3,4}АБАКУМОВ М.А.

**РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА И ЕГО
СЛОЖНОЭФИРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ**

¹*МИРЭА – Российский Технологический Университет, Институт Тонких
Химических Технологий им. М.В. Ломоносова г. Москва, Россия*

²*Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

³*Российский Национальный Исследовательский Медицинский
Университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

⁴*Национальный Исследовательский Технологический Университет
«МИСиС», Москва, Россия
г. Москва*

e-mail: ostroverhov@mirea.ru

¹OSTROVERKHOV P.V., ¹LOBANOV I.A., ¹AFAUNOV A.A., ¹
MARTSINKEVICH E.M., ¹KHASKHANOVA I.M., ²VLASOVA K.YU.,
^{3,4}ABAKUMOV M.A.

**DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR
DETERMINATION OF 2,4-DINITROPHENOL AND ITS ETHER
DERIVATIVES**

¹*MIREA – Russian Technological University, Lomonosov Institute of Fine
Chemical Technologies, Moscow, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russia*

³*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

⁴*National University of Science and Technology (MISIS), Moscow, Russia*

e-mail: ostroverhov@mirea.ru

Аннотация: в настоящее время сахарный диабет второго (СД-2) типа и часто сопутствующая ему неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) крайне распространены в мире и России. Ранее для борьбы с этими заболеваниями в медицинской практике применялся недолгое время 2,4-динитрофенол, анкаплер окислительного фосфорилирования, но было обнаружено, что его применение сопряжено с тяжёлыми побочными эффектами, среди которых кардио- и гепатотоксичность. Использование сложноэфирных производных 2,4-динитрофенола в составе липосом может решить эту проблему. Но при этом требуется экспрессный метод оценки качества и количества 2,4-ДНФ и его производных в составе липосомальных форм. В данной работе эта задача была решена при помощи метода газовой хроматографии.

Abstract: Currently, type 2 diabetes (DM-2) and the often concomitant non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are extremely common in the world

and in Russia. Previously, 2,4-dinitrophenol, an oxidative phosphorylation uncoupler, was used for a short time in medical practice to combat these diseases, but it was found that its use is associated with severe side effects, including cardiovascular and hepatotoxicity. The use of ester derivatives of 2,4-dinitrophenol in liposomal form can solve this problem. But this requires an express method for assessing the quality and quantity of 2,4-DNP and its derivatives in liposomal forms. In this work, this problem was solved using the gas chromatography.

Ключевые слова: 2,4-динитрофенол, сложные эфиры ДНФ, ГХ, Сахарный диабет второго типа, НАЖБП

Keywords: 2,4-Dinitrophenol, DNP esters, GC, Type 2 Diabetes, NAFLD

Цель исследования. Сахарный диабет 2 типа (СД-2) и неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) являются актуальными проблемами современной медицины. По отдельности или в сочетании эти хронические заболевания приводят к высокому риску инвалидности и смертности. НАЖБП все чаще становится наиболее частым заболеванием печени, поражающим взрослых и детей [1]. Исходя из вышеизложенного разработку методов количественного анализа и контроля качества лекарственных средств, позволяющих предотвратить и лечить НАЖБП и СД-2, чрезвычайно важны. В настоящее время в клинике используется ряд препаратов, предназначенных для лечения СД-2, но медикаментозного лечения НАЖБП не существует.

Однако, одной из многообещающих молекул, которые могут быть эффективными и безопасными при лечении НАЖБП, является 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ), изменяющий активность митохондрий. 2,4-ДНФ действует как переносчик протона через мембрану митохондрий, рассеивая градиент митохондриальных протонов и способствуя тепловому рассеянию энергии в результате окисления митохондриального субстрата. Раньше 2,4-ДНФ широко использовался для похудения, но его прекратили применять из-за зачастую летальных побочных эффектов, таких как высокая токсичность, смертельная гипертермия и т. д. [2]. Тяжесть этих побочных эффектов требует разработки эффективной лекарственной формы 2,4-ДНФ, нацеленной на печень. В настоящее время имеется мало экспериментальных работ, направленных на разработку лекарственной формы 2,4-ДНФ для перорального и инвазивного введения [3]. Оба препарата были эффективны при лечении НАЖБП, но, к сожалению, они имели некоторые ограничения. Шульман и соавторы синтезировали и изучили пролекарственную форму 2,4-ДНФ, нацеленную на печень, для перорального применения - 2,4-ДНФ-метилловый эфир (DNPME). Они показали многообещающее увеличение терапевтического окна для DNPME и соотношения токсической и эффективной дозы (в 50 раз). Наиболее существенными ограничениями использования этого пролекарства являются высокая пиковая концентрация в плазме и быстрое высвобождение [3].

Мы полагаем, что использование липосомальной композиции для инвазивного введения позволит преодолеть указанные недостатки и упростить адресную доставку в печень и замедленное высвобождение 2,4-ДНФ, так как ряд исследований продемонстрировал, что липосомы могут накапливаться в печени избирательно [4,5], что важно для терапии с помощью 2,4-ДНФ.

Однако для проведения биологических испытаний полученных ранее производных и их липосомальных форм необходимо точно рассчитывать дозировки. При этом сложноэфирные производные 2,4-ДНФ могут разлагаться в процессе хранения и загрузки в липосомы. Следовательно, необходимой является разработка экспрессного метода определения количества сложноэфирных производных 2,4-ДНФ.

В данной работе мы приводим описание метода определения 2,4-ДНФ и его сложноэфирных производных (Рисунок 1) методом газовой хроматографии.

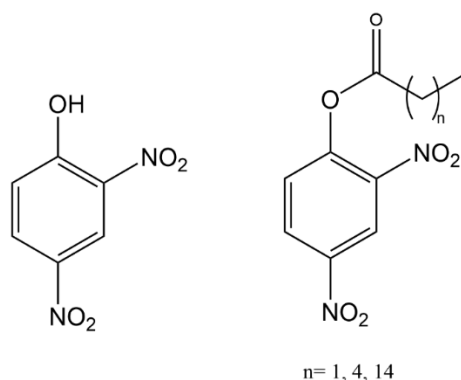


Рисунок 1 Структуры 2,4-динитрофенола и его сложноэфирных производных

Материалы и методы исследования. Определение качественного и количественного состава смеси проводили на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором, с использованием капиллярной колонкой «BP-10» (14% цианопропилфенил-86% метилполисилаксан), длиной 25 м, диаметром 0.32 мм, толщиной пленки 0.25 мкм. Анализ выполняли при начальной температуре термостата колонок 190 °С с выдержкой 0 мин., дальнейшим нагревом до 215 °С со скоростью 5 °С/мин., и выдержкой 15 мин. продолжительность анализа 20 мин. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения «Хроматэк Аналитик», версия 3.0.

В работе использованы 2,4-динитрофенол и его производные, полученные с использованием карбоновых кислот (Рисунок 1) (пропионовая, пентановая, гексановая, гептановая, пальмитиновая (Merck, Sigma-Aldrich)). Все соединения были выделены и очищены при помощи колоночной хроматографии (Силикагель 60 0,040-0,063 мм, Merck), а их структура надежно подтверждена комплексом физико-химических методов

анализа, таких как ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии (Спектрометр «Bruker» DPX-300, Германия, 300 МГц.) и масс спектрометрии (Времяпролетный масс-спектрометр «Bruker» Ultraflex TOF/TOF, Германия, MALDI с использованием в качестве матрицы дигидроксибензола).

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе разработке экспрессного метода определения количества 2,4-ДНФ и его производных было показано, что метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, который обычно используется для количественной оценки степени включения препаратов с состав наноструктур, не подходит, так как наблюдается разрушение сложноэфирных производных 2,4-ДНФ, что затрудняет интерпретацию результатов анализа.

Поэтому был разработан метод определения 2,4-ДНФ с использованием газовой хроматографии, описанный в разделе «Материалы и методы исследования». Была продемонстрирована эффективность и точность метода, который позволяет отдельно определять как 2,4-ДНФ так и его производные, при этом не происходит их разрушения, и, следовательно, способствует однозначности интерпретации результатов.

Для проверки применимости и валидации метода сначала исследовали индивидуальные 2,4-ДНФ и его производные. Для проведения количественного анализа исследуемых смесей была проведена абсолютная градуировка по 5 точкам с использованием стандартных смесей с известными концентрациями. Среднеквадратичное отклонение (СКО) по всем компонентам не превышает 1,0 %, что свидетельствует о высокой воспроизводимости и достоверности метода.

Выводы. Разработанный метод определения количества и степени очистки 2,4-динитрофенола и его сложноэфирных производных может быть использован, как основной инструмент для проведения контроля качества препаратов против СД-2 и НАЖБП. Валидация метода была проведена.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда No. 20-73-00333.

Список литературы

1. Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, et al. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J. Diabetes Res.* 2020 (2020).
2. Sousa D, Carmo H, Roque Bravo R, et al. Diet aid or aid to die: an update on 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) use as a weight-loss product. *Arch. Toxicol.* 94(4), 1071–1083 (2020).
3. Perry RJ, Kim T, Zhang XM, et al. Reversal of hypertriglyceridemia, fatty liver disease, and insulin resistance by a liver-targeted mitochondrial uncoupler. *Cell Metab.* 18(5), 740–748 (2013).

4. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics*. 9(2), 1–33 (2017).
5. Samuelsson E, Shen H, Blanco E, Ferrari M, Wolfram J. Contribution of Kupffer cells to liposome accumulation in the liver. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 158, 356–362 (2017).

СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., БАТАШЕВ С.А.
**МЕТОД ГЖХ В ОПРЕДЕЛЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОДУКТОВ
МЕТОКСИКАРБОНИЛИРОВАНИЯ ОКТЕНА-1 В СРЕДЕ
ТОЛУОЛА**

*Тулский государственный педагогический университет
им. Л.Н. Толстого, г. Тула
e-mail: sevostyanova.nt@gmail.com*

SEVOSTYANOVA N.T., BATASHEV S.A.
**THE GLC METHOD IN DETERMINING OF THE OCTENE-1
METHOXYCARBOXYLATION PRODUCT CONCENTRATIONS IN
THE TOLUENE MEDIUM**

*Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula
e-mail: sevostyanova.nt@gmail.com*

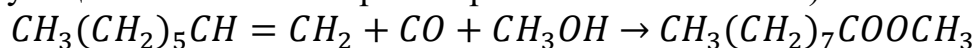
Аннотация: Метоксикарбонилирование октена-1, катализируемое гомогенными системами на основе палладия, позволяет получать в одну стадию метилпеларгонат – потенциальный полупродукт для фармацевтического синтеза. В этой связи была разработана методика количественного определения метилпеларгоната методом ГЖХ. Точность определения составила 98,3%, воспроизводимость – 96 %.

Abstract: The Octene-1 methoxycarbonylation catalyzed by homogeneous palladium-based systems makes it possible to obtain methyl pelargonate, a potential intermediate for pharmaceutical synthesis, in one stage. In this regard, a method for the quantitative determination of methyl pelargonate by the GLC method was developed. The determination accuracy was 98.3 %, reproducibility – 96 %.

Ключевые слова: Газо-жидкостная хроматография, метилпеларгонат, внутренний стандарт, метоксикарбонилирование, октен-1, поправочный коэффициент, точность методики.

Keywords: Gas-liquid chromatography, methyl pelargonate, internal standard, methoxycarbonylation, octene-1, correction factor, accuracy of the technique

Цель исследования. Синтезы с участием ненасыщенных углеводородов, спиртов и СО, осуществляемые при гомогенном катализе системами на основе соединений палладия, органофосфинов и сильных протонных кислот, позволяют получать ценные сложные эфиры в мягких условиях. В частности, метоксикарбонилирование октена-1 приводит к образованию в мягких условиях метилпеларгоната – потенциального полупродукта в синтезе ванилиламида пеларгоновой кислоты (действующего компонента противоревматических мазей):



Реакция сопровождается образованием двух побочных эфиров разветвленного строения – метилового эфира 2-метилоктановой кислоты и метилового эфира 2-этилгептановой кислоты [1, 2].

Определение выхода целевого продукта требует использования точной методики анализа реакционной массы. В этой связи целью работы являлась разработка методики количественного определения метилпеларгоната с помощью газо-жидкостной хроматографии, определения поправочного коэффициента для метилпеларгоната и статистических характеристик методики.

Материалы и методы исследования. Для определения концентрации метилпеларгоната был выбран метод внутреннего стандарта. Стандартные растворы для разработки методики анализа были максимально приближены к составу реакционной массы синтеза метилпеларгоната и готовились методом навесок. Растворы включали внутренний стандарт о-ксилол (ТУ 6-09-3825-88, для хроматографии), метилпеларгонат (марки Sigma-Aldrich, 98,0%), метанол как реагент для метоксикарбонилирования (ГОСТ 2222-95) и растворитель – толуол (ГОСТ 5789-78, ч.д.а.). Критериями чистоты используемых веществ служили температура кипения и показатель преломления.

Анализ проводили на газовом хроматографе «Цвет 160» с пламенно-ионизационным детектором. Исследуемая система «октен-1 – метанол – метилпеларгонат – толуол» содержит вещества, различающиеся по полярности. В этой связи для анализа был выбран сорбент Chromaton N-AW DMCS 0,16-0,20 mm с 15% нанесенной неподвижной фазы средней полярности Reoplex 400 (пропиленгликоль-1,2-адипинат). В качестве подвижной фазы применялся аргон с расходом 30 мл/мин. Для эффективного разделения компонентов смеси использовалась стеклянная колонка длиной 3 м и внутренним диаметром 3 мм. Применялся режим программирования температуры в диапазоне 60-180 °С со скоростью нагрева 8 °С/мин. Температура испарителя составляла 225 °С. Объем вводимой в хроматограф пробы составлял 1,0 мкл. Идентификацию компонентов проводили по временам удерживания, которые определяли хроматографированием чистых веществ. Площади пиков определяемых компонентов (о-ксилола и метилпеларгоната) определяли с использованием

интегратора МультиХром. Наличие грубых ошибок в результатах анализа оценивалось по Q-критерию.

Результаты исследования и их обсуждение. Был проведен газохроматографический анализ серии из пяти стандартных растворов, содержащих 0,0500 М о-ксилола, 0,02–0,10 М метилпеларгоната, метанола и октена-1. Анализ одного раствора занимал 15 минут. Каждый стандартный раствор хроматографировали пять раз. В условиях анализа пики всех компонентов стандартных растворов удовлетворительно разделялись. Число теоретических тарелок для о-ксилола и метилпеларгоната составляло 2108 и 9990 соответственно.

Было установлено, что в указанном диапазоне отношение площадей пиков метилпеларгоната и о-ксилола линейно зависит от концентрации метилпеларгоната. Среднее значение поправочного коэффициента k , рассчитанное на основании всего массива данных по пяти стандартным раствором, составило 1,379. С использованием критерия Стьюдента был рассчитан доверительный интервал этого коэффициента 0,024. Воспроизводимость результатов определения содержания метилпеларгоната составила 96,0 %. Среднее значение относительной ошибки прямого определения было равно 1,7 %. Точность хроматографического определения метилпеларгоната составила 98,3%.

Выводы.

1. Установлено, что разработанная методика количественного определения метилпеларгоната работает удовлетворительно в исследуемом диапазоне концентраций определяемого компонента от 0 до 0,1 М.
2. В результатах по определению метилпеларгоната было допущено 4 % грубых ошибок.
3. Значение калибровочного коэффициента для определения концентрации метилпеларгоната составило $1,379 \pm 0,024$.
4. Воспроизводимость результатов по определению содержания метилпеларгоната составила 96,0%.
5. Точность хроматографического определения метилпеларгоната составила 98,3%, что приемлемо для использования разработанной методики в аналитических целях при исследовании реакции метоксикарбонилирования октена-1.
6. Разработанная методика определения метилпеларгоната отличается экспрессностью, поскольку требует всего 15 минут, что позволяет использовать ее в ходе кинетических исследований реакции метоксикарбонилирования октена-1 для анализа большого числа проб реакционной массы.

Список литературы

1. Аверьянов В. А., Баташев С. А., Севостьянова Н. Т., Зарытовский В. М. Влияние условий на скорость и селективность

гидрокарбметоксилирования октена-1, катализируемого фосфиновым комплексом палладия // Катализ в промышленности. 2005. N 2. С. 25-33.

2. Баташев С. А., Севостьянова Н. Т. Модель селективности по метилпеларгонату реакции гидрокарбметоксилированию октена-1, катализируемой системой $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2 - \text{PPh}_3 - \text{п-толуолсульфо}$ кислота – Текст : непосредственный // Известия Академии наук. Серия химическая. 2020. N 8. С. 1561-1568.

СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., БАТАШЕВ С.А.
**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОДЫ В N-МЕТИЛПИРРОЛИДОНЕ**

Тульский государственный педагогический университет

им. Л.Н. Толстого, г. Тула

e-mail: sevostyanova.nt@gmail.com

SEVOSTYANOVA N.T., BATASHEV S.A.
**DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUE OF
WATER DETERMINATION IN N-METHYLPYRROLIDONE**

Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula

e-mail: sevostyanova.nt@gmail.com

Аннотация: традиционно используемый для определения воды в органических реактивах метод титрования реактивом Фишера имеет ряд серьезных недостатков. В этой связи был разработан метод определения воды в полярном растворителе N-метилпирролидоне с помощью газо-жидкостной хроматографии. Методика основана на применении способа добавок, отличается простотой, точностью (98,3 %) и экспрессностью.

Abstract: Traditionally used for the water determination in organic reagents, the Fischer reagent titration method has a number of serious disadvantages. In this regard, a method was developed for the water determination in the polar solvent N-methylpyrrolidone using gas-liquid chromatography. The technique is based on the additive method application, is characterized by simplicity, accuracy (98.3%) and expressiveness.

Ключевые слова: Газо-жидкостная хроматография, детектор по теплопроводности, N-метилпирролидон, определение воды, способ добавок.

Keywords: Gas-liquid chromatography, thermal conductivity detector, N-methylpyrrolidone, determination of water, method of additives.

Цель исследования. N-метилпирролидон представляет собой лактам γ -аминомасляной кислоты. Этот азотсодержащий полярный гигроскопичный растворитель смешивается с водой и органическими

растворителями, применяется в качестве экстрагента в процессе промышленного получения углеводов, в качестве осадителя и среды в производстве полимеров и в электрохимических исследованиях [2, 4]. При этом к N-метилпирролидону предъявляется ряд требований по чистоте, в том числе по содержанию воды. В этой связи целью работы стала разработка методики определения примеси воды в N-метилпирролидоне с использованием метода газо-жидкостной хроматографии.

Материалы и методы исследования. Традиционно для определения воды в органических реактивах применяется метод титрования реактивом Фишера. Однако этот способ имеет ряд недостатков: нестойкость при длительном хранении, необходимость стандартизации перед применением, специфичность оборудования для исключения контакта реактива Фишера с атмосферной влагой (особенно при определении небольших примесей воды), а также токсичность и неприятный запах [3]. В этой связи был выбран альтернативный метод – газо-жидкостной хроматографии.

Для анализа использовался газовый хроматограф «Цвет 160» с детектором по теплопроводности и подвижной газовой фазой – гелием – с расходом 30 мл/мин. Колонка длиной 3 м внутренним диаметром 3 мм была заполнена сорбентом Chromaton N-AW DMCS 0,160-0,200 мм с 20 % нанесенной неподвижной жидкой фазой Carbowax 20M. Анализ проводили в изотермическом режиме при 200 °С. Температура испарителя поддерживалась на уровне 250 °С. Объем вводимой в хроматограф пробы составлял 6,0 мкл. Длительность анализа составляла 15 мин. Площадь пика воды определяли с помощью аппаратно-программного комплекса МультиХром. Для расчета концентрации воды применяли метод абсолютной калибровки.

В работе использовался N-метилпирролидон (ч.д.а., производитель АО «ЭКОС-1»), содержание воды не более 0,1 %).

В промышленных процессах, в первую очередь в производстве полимеров, зачастую предельно допустимая концентрация воды в используемом N-метилпирролидоне очень низкая, поэтому количество влаги необходимо строго контролировать. Разработка методик определения примеси вещества в каком-либо продукте требует использования стандартного вещества без таковой примеси. Однако товарный N-метилпирролидон является гигроскопичным веществом, от содержащегося в нем небольшого количества воды проблематично избавиться. В этой связи был выбран способ добавок [1]. В соответствии с ним методом навесок были приготовлены семь стандартных растворов с различной концентраций добавленной воды в N-метилпирролидоне. Нулевым образцом являлся непосредственно N-метилпирролидон. Каждый образец хроматографировали три раза.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты хроматографирования серии образцов N-метилпирролидона с добавками

воды представлены на Рисунке. Можно видеть, что в диапазоне добавок воды 0-0,05 % (мас.) зависимость площади пика воды от содержания добавленной воды имеет линейный характер (уравнение этой прямой представлено на Рисунке). С учетом доверительных интервалов это уравнение имеет вид:

$$\omega = (0,96 \pm 0,13) + (137,5 \pm 2,3)x, \text{ где } x - \text{ добавка воды (мас. \%)}.$$

Исходный N-метилпирролидон без добавленной воды – нулевая точка на рис. 1 – содержит примесь воды (площадь пика 0,9589 мВ·с.). Тангенс угла наклона представленной прямой является поправочным коэффициентом для расчета концентрации воды в N-метилпирролидоне и равен 137,5 мВ·с. Концентрацию воды в исходном N-метилпирролидоне можно рассчитать по формуле: $\omega = 0,96 / 137,5 = 0,0070 \%$.

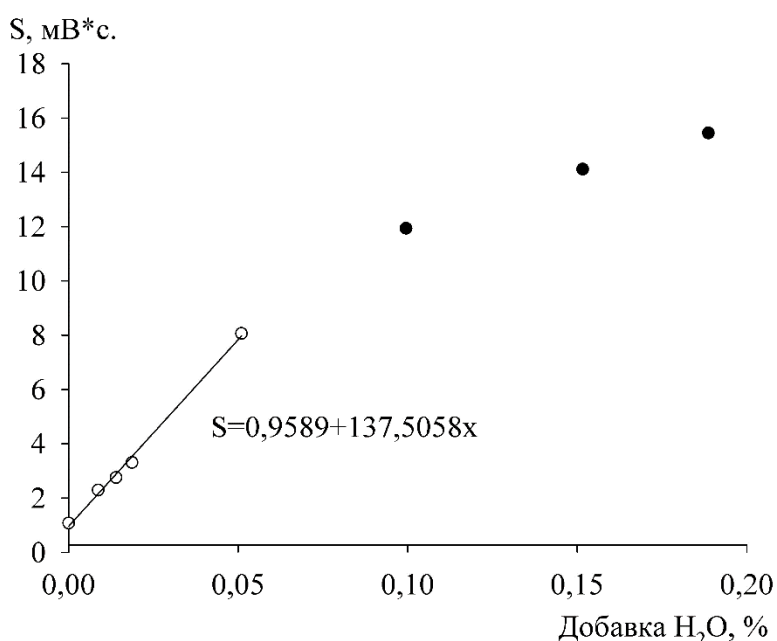


Рисунок 1 – Зависимость площади пика H₂O от количества H₂O, добавленной к товарному N-метилпирролидону.

Среднее значение относительной ошибки прямого определения было равно 1,7 %, точность хроматографического определения – 98,3 %.

Выводы.

1. Установлено, что метод газо-жидкостной хроматографии с применением детектора по теплопроводности применим для определения примесей воды в N-метилпирролидоне.
2. Способ добавок позволяет с требуемой точностью определять поправочный коэффициент для расчета содержания примеси определяемого компонента.
3. Метод газо-жидкостной хроматографии не требует никаких реактивов кроме анализируемого N-метилпирролидона и может

использоваться в качестве удобной и надежной альтернативы традиционному способу титрования реактивом Фишера.

Список литературы

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: В 2 т.: Пер. с англ. / Под ред. Р. Кельнера, Ж.-М. Мерме, М. Отто, М. Видмера. Москва: «Мир»: ООО «Издательство АСТ», 2004. Т. 1. 608 с.
2. Крешков А. П. Аналитическая химия неводных растворов. М.: Химия, 1982. 256 с.
3. Ничуговский Г. Ф. Определение влажности химических веществ. Л.: Химия, 1977. 200 с.
4. Химический энциклопедический словарь / Гл. ред. И. Л. Кнунянц. М.: Советская энциклопедия, 1983. 792 с.

СЕВОСТЬЯНОВА Н.Т., БАТАШЕВ С.А.
**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА
РЕАКЦИОННОЙ МАССЫ АЛКОКСИКАРБОНИЛИРОВАНИЯ
ЦИКЛОГЕКСЕНА ЦИКЛОГЕКСАНОЛОМ И СО**

*Тульский государственный педагогический университет
им. Л.Н. Толстого, г. Тула
e-mail: sevostyanova.nt@gmail.com*

SEVOSTYANOVA N.T., BATASHEV S.A.
**DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR DETERMINING THE
REACTION MASS COMPOSITION OF CYCLOHEXENE
ALKOXYCARBONYLATION WITH CYCLOHEXANOL AND CO**

*Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula
e-mail: sevostyanova.nt@gmail.com*

Аннотация: Алкоксикарбонилирование циклогексена позволяет получать в одну стадию ценный продукт – циклогексилциклогексанкарбоксилат. Была разработана методика количественного хроматографического определения компонентов реакционной массы синтеза этого продукта. Точность определения различных компонентов и воспроизводимость результатов достигали 99,9%.

Abstract: The cyclohexene alkoxy carbonylation makes it possible to obtain a valuable product – cyclohexyl cyclohexanecarboxylate – in one stage. A method of quantitative chromatographic determination of the reaction mass components of this product synthesis has been developed. The various

components determination accuracy and the results reproducibility reached 99.9%.

Ключевые слова: Газо-жидкостная хроматография, циклогексилциклогексанкарбоксилат, внутренний стандарт, алкоксикарбонилирование, циклогексен, поправочный коэффициент, точность методики.

Keywords: Gas-liquid chromatography, cyclohexyl cyclohexanecarboxylate, internal standard, alkoxy carbonylation, cyclohexene, correction factor, technique accuracy.

Цель исследования. Алкоксикарбонилирование ненасыщенных соединений спиртами и СО, катализируемое соединениями палладия, позволяет получать разнообразные сложные эфиры в мягких условиях с высокими выходами. Так, реакция алкоксикарбонилирования циклогексена циклогексанолом и СО приводит к образованию циклогексилциклогексанкарбоксилата, который может найти применение в качестве добавки к различным видам топлив и полимерам. Реакция не сопровождается образованием каких-либо других продуктов [1, 2]. При исследовании закономерностей синтеза циклогексилциклогексанкарбоксилата возникает необходимость контроля состава реакционной массы. Целью работы стала разработка методики хроматографического анализа реакционной массы алкоксикарбонилирования циклогексена циклогексанолом и СО.

Материалы и методы исследования. Для определения концентрации участников реакции (циклогексена, циклогексанола и циклогексилциклогексанкарбоксилата) применялся метод внутреннего стандарта, в качестве которого использовался о-ксилол. Стандартные растворы для разработки методики анализа включали все эти компоненты и растворитель толуол. Циклогексилциклогексанкарбоксилат был синтезирован, очищен вакуумной дистилляцией и имел чистоту 99,0 % по ГЖХ. о-Ксилол был марки ТУ 6-09-3825-88, для хроматографии. Циклогексанол марки “С” обезвоживали оксидом кальция, после чего подвергали дистилляции. Толуол имел марку ГОСТ 5789-78, ч.д.а. Критериями чистоты используемых веществ служили температура кипения и показатель преломления.

Для анализа применялся метод газо-жидкостной хроматографии с использованием газового хроматографа «Цвет 160» с пламенно-ионизационным детектором и подвижной газовой фазой – аргоном – с расходом 30 мл/мин. Компоненты анализируемых растворов обладали различной полярностью. В этой связи было отдано предпочтение сорбенту Chromosorb W 80-100 mesh с 3 % нанесенной неподвижной фазы OV-275, относящейся к фазам средней полярности. Для эффективного разделения компонентов смеси была выбрана колонка длиной 3 м внутренним

диаметром 3 мм и режим программирования температуры от 75 до 175 °С со скоростью нагрева 8 °С/мин. Температура испарителя поддерживалась на уровне 250 °С. Объем вводимой в хроматограф пробы составлял 1,0 мкл. Идентификацию компонентов стандартных растворов проводили по временам удерживания, которые устанавливались при хроматографировании индивидуальных веществ. Площади пиков компонентов определяли с помощью интегратора МультиХром. Для обнаружения грубых ошибок в результатах анализа использовали Q-критерий.

Был проведен газохроматографический анализ серии из пяти стандартных растворов, содержащих 0,05 М о-ксилола, от 0,02–0,10 М циклогексена и циклогексилциклогексанкарбоксилата. Концентрация циклогексанола в этих растворах варьировала от 0,1 до 0,5 М. Анализ одного раствора длился 20 минут. Для каждого стандартного раствора проводилось пять параллельных хроматографирований. В условиях анализа пики всех компонентов стандартных растворов удовлетворительно разделялись.

Результаты исследования и их обсуждение. Было установлено, что в указанном диапазоне концентраций зависимости отношений площадей пиков определяемых компонентов к площади пика о-ксилола от концентраций этих компонентов имеют линейный характер. На основании массивов данных по пяти стандартным растворам были определены средние значения поправочных коэффициентов с доверительными интервалами, рассчитанными с применением критерия Стьюдента, $k \pm \Delta k$, равные (моль/л) $0,941 \pm 0,027$ (для циклогексена), $1,429 \pm 0,010$ (для циклогексанола) и $1,340 \pm 0,015$ (для циклогексилциклогексанкарбоксилата). Воспроизводимость результатов определения различных компонентов стандартных растворов составила 99,97–99,99 %. Среднее значение относительной ошибки прямого определения было равно 1,5 %. Точность хроматографического определения варьировала в пределах 98,3–99,3 %.

Выводы.

1. Установлено, что разработанная методика количественного определения циклогексена, циклогексанола и циклогексилциклогексанкарбоксилата работает удовлетворительно в исследуемом диапазоне концентраций определяемых компонентов от 0 до 0,1 М.

2. В результатах по определению циклогексена и циклогексанола было допущено незначительное количество грубых ошибок – 3,3 и 6,7 % соответственно, в результатах определения циклогексилциклогексанкарбоксилата грубых ошибок не было выявлено.

3. Значения калибровочных коэффициентов для определения концентрации циклогексена, циклогексанола и

циклогексилциклогексанкарбоксилата составили (моль/л) $0,941 \pm 0,027$, $1,429 \pm 0,010$ и $1,340 \pm 0,015$ соответственно.

4. Воспроизводимость результатов по определению содержания циклогексена, циклогексанола и циклогексилциклогексанкарбоксилата составила 99,97–99,99 %.

5. Точность хроматографического определения варьировала в пределах 98,3–99,3 %, что является очень высоким показателем и позволяет использовать разработанную методику в аналитических целях при исследовании реакции алкоксикарбонилирования циклогексена циклогексанолом и СО.

6. Разработанная методика анализа реакционной массы синтеза циклогексилциклогексанкарбоксилата отличается экспрессностью, что позволяет использовать ее в ходе исследований реакции алкоксикарбонилирования при анализе большого числа проб реакционной массы.

Список литературы

1. Аверьянов В. А., Севостьянова Н. Т., Баташев С. А. Кинетические закономерности гидрокарбалкоксилирования циклогексена циклогексанолом, катализируемого системой $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2 - \text{PPh}_3 - \text{п-толуолсульфокислота}$ // Нефтехимия. 2008. Т. 48. N 4. С. 286-294.

2. Аверьянов В. А., Севостьянова Н. Т., Баташев С. А., Несолена С. В. Механизм каталитического действия системы $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2 - \text{PPh}_3 - \text{п-толуолсульфокислота}$ на реакцию гидрокарбалкоксилирования циклогексена в среде циклогексанола // Нефтехимия. 2006. Т. 46. N 6. С. 435-445.

ЧУБУКИНА Т.К.
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФИРНО-МАСЛИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ
РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ МЕТОДОМ ХРОМАТОМАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ**

*Кубанский государственный университет, г. Краснодар
e-mail: t.chubukina@yandex.ru*

CHUBUKINA T.K.
**DETERMINATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS OF
CHAMOMILE BY CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY**

*Kuban State University, Krasnodar
e-mail: t.chubukina@yandex.ru*

Аннотация: проведено исследование экстрактов цветов ромашки аптечной для идентификации в них эфирно-масличных компонентов. Методом газовой хроматомасс-спектрометрии проанализировали извлечения эфирно-масличных компонентов, полученные при гидродистилляции и докритической CO₂-экстракции. Были идентифицированы около 30 компонентов.

Abstract: a study of chamomile flowers extracts was carried out to identify characteristic essential oil components in them. Extracts of essential oil components obtained by hydrodistillation and subcritical CO₂-extraction were analyzed by gas chromatography mass spectrometry. About 30 components have been identified.

Ключевые слова: ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.), эфирно-масличные компоненты, гидродистилляция, CO₂-экстракция, хроматомасс-спектрометрия.

Keywords: chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), essential oil components, hydrodistillation, CO₂-extraction, chromatography mass spectrometry.

Цель исследования. Целью исследования являлось определение эфирно-масличных компонентов ромашки аптечной методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при проведении экстракции разными способами.

Материалы и методы исследования. Для выполнения исследований использовали: сита лабораторные по ГОСТ 51568-99; весы аналитические «Adventurer» по ГОСТ 16474-74; электроплитка бытовая «Искорка», Вятка; колба круглодонная вместимостью 2000 мл по ГОСТ 25336-82; одноканальные механические дозаторы «Biohit proline» с варьируемым объемом дозирования 100–1000 мкл; виалы на 1,5 мл Screw-cap, прозрачного стекла («Chromacol LTD», Великобритания); гексан (ос.ч., Криохром, Россия); безводный сульфат натрия (х.ч., Вектон, Россия); вода

дистиллированная по ГОСТ 6709-72; деионизованная вода, полученная на установке Milli-Q-UV («Millipore», Франция). Разделение проводили на хроматографе Shimadzu GC-2010 с масс-спектрометрическим детектором GCMS-QP2010 Plus на кварцевой капиллярной колонке HP-ULTRA 1 (50 м × 0.20 мм, 0.33 мкм) (Agilent Technologies, США) с использованием программируемого режима нагрева колонки (70°C (0–3 мин), нагрев до 130°C (3–10.5 мин), 130°C (10.5–13.5 мин), нагрев до 238°C (13.5–27 мин), 238°C (27–32 мин), нагрев до 290°C (32–38.5 мин), 290°C (38.5–55.5 мин)). Объем вводимой пробы – 1 мкл. Температура термостата колонки, инжектора, ионного источника и интерфейса составляла 70, 260, 200 и 280°C соответственно, напряжение на детекторе 1.2 кВ, скорость сканирования масс-спектра 1250 а. е. м./с, диапазон сканируемых масс 34–600 m/z, ионизация электронным ударом. В качестве газа-носителя использовали гелий, линейная скорость потока 25.1 см/мин. Коэффициент деления – 25. Идентификацию проводили сопоставлением полученных масс-спектров со спектрами индивидуальных соединений и данными библиотек NIST07, WILEY8.

Результаты исследования и их обсуждение. Эфирные масла лекарственных растений представляют особый интерес для использования в медицинских целях благодаря содержанию в них сложного комплекса биологически активных веществ: кислородсодержащих моно-, ди- и сесквитерпеноидов, алифатических или ароматических (фенольных) соединений [5]. Их наличие обеспечивает антиоксидантную активность, антибактериальное, противовирусное, противогрибковое, антимикробное, обезболивающее, противовоспалительное, антиаллергическое, противоопухолевое, седативное действие [2, 3]. Несмотря на достаточную распространенность применения лекарственного сырья, химический состав многих растений изучен недостаточно. Поэтому разработка новых экспрессных и универсальных методик для определения биологически активных веществ в лекарственных растениях представляет перспективное направление исследований.

Для определения содержания биологически активных компонентов растений необходимо проводить их экстракцию. Предварительно сырье сушат воздушно-теневым способом, измельчают и просеивают [4]. Традиционным способом экстракции эфирно-масличных компонентов из растительного сырья является гидродистилляция. Способ извлечения, так же как и ряд других факторов (условия произрастания, генетика, условия хранения и др.), влияет на качественный и количественный состав полученных экстрактов [1,2]. Помимо этого, при выборе способа экстракции важно учитывать сложность проведения и длительность процесса, физико-химические свойства целевых компонентов (растворимость, полярность и т.д.), возможность дальнейшего хранения и использования. Использование газовой хроматографии с масс-

спектрометрическим детектированием позволяет не только проводить идентификацию, но и определять количественное содержание компонентов в нативном виде.

В рамках данной работы исследованы извлечения эфирно-масличных компонентов из цветов ромашки аптечной («Родные травы», сбор на территории Адыгеи и Краснодарского края) при экстракции их различными способами: гидродистилляцией (по методике, рекомендованной Государственной Фармакопеей РФ) [4] и докритической CO₂-экстракцией (проведена в ООО «Компания Караван» на экспериментальной установке под давлением 58 атм при 31°C). В первом случае получали эфирное масло и ароматную воду. Перед анализом методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием эфирное масло разбавляли гексаном и удаляли возможные остатки воды добавлением безводного сульфата натрия. Перед анализом CO₂-экстракта его также разбавляли гексаном. Для идентификации эфирно-масличных компонентов в полученной ароматной воде методом газовой хроматомасс-спектрометрии предварительно проводили их реэкстракцию в гексан. В оптимизированных условиях хроматографического анализа проводили идентификацию эфирно-масличных компонентов ромашки аптечной сопоставлением полученных масс-спектров с данными библиотек NIST07 и WILEY8.

Установлено, что эфирное масло, полученное при гидродистилляции, содержит 36 компонентов, ароматная вода – 21 компонент, а CO₂-экстракт – 24 компонента. По результатам количественного анализа основные компоненты – α-Бисаболол оксид В, Бисаболол оксид А, Бисаболон оксид, β-Фарнезен, Спатуленол.

Выводы. Таким образом, методом газовой хроматомасс-спектрометрии изучен состав эфирного масла и ароматной воды, полученных при гидродистилляции, и состав экстракта цветов ромашки аптечной, полученного при докритической CO₂-экстракции. Максимальное количество компонентов содержится в эфирном масле. Однако докритическая экстракция является более экспрессным и менее затратным способом извлечения. Такой способ является перспективным для дальнейших исследований.

Исследования проводили при финансовой поддержке РФФИ (проект № 075-Г/3/Х2295/685/2) с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского госуниверситета.

Список литературы

1 Baczek, K.B., Arbuscular mycorrhizal fungi in chamomile (*Matricaria recutita* L.) organic cultivation / K.B. Baczek, M. Wisniewska, J.L. Przybyl, O. Kosakowska, Z. Weglarz // *Industrial Crops & Products*. – 2019. – №140. – Article 111562.

2 Correlation between chemical composition and radical scavenging activity of 10 commercial essential oils: Impact of microencapsulation on functional properties of essential oils / H. H. M. Fadel [et. al] // Arabian Journal of Chemistry. – 2020. – №13. – С.6815–6827.

3 The Composition of Essential Oils Obtained from *Achillea millefolium* and *Matricaria chamomilla* L., Originary from Romania / M. D. Berechet [et. al] // REV.CHIM. – 2017. – №68(12). – С. 2787-2795.

4 Государственная Фармакопея РФ / XIV издание. Т. I-III. Москва: 2018.

5 Карпук, В. В., Фармакогнозия / Карпук В. В.. – Минск: БГУ, 2011. – 334 с.

ЯКОВЕЦ Н.В., КРУТЬКО Н.П.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГАЗООБРАЗНЫХ И ЖИДКИХ ПРОДУКТОВ ТЕРМОЛИЗА НЕФТЯНЫХ ОСТАТКОВ

*Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск
E-mail: yakovetsnataly@gmail.com*

YAKAVETS N.V., KRUTKO N.P.

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF GAS AND LIQUID PRODUCTS OF OIL RESIDUES THERMOLYSIS

*Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus, Minsk
E-mail: yakovetsnataly@gmail.com*

Аннотация: Газообразные и жидкие продукты термолиза нефтяных остатков, модифицированных химическими добавками, проанализированы методами газовой и газожидкостной хроматографии (с имитированной дистилляцией). Применение добавок оказывает положительный эффект на термические превращения нефтепродуктов: увеличение выхода и улучшение качества дистиллятных фракций, снижение коксообразования.

Abstract: Gaseous and liquid products of thermolysis of oil residues modified with chemical additives were analyzed by gas and gas-liquid chromatography (with simulated distillation). The use of additives has a positive effect on the thermal transformations of petroleum products: an increase of the yield and improvement of the quality of distillate fractions, a decrease of coke formation.

Ключевые слова: нефтепродукты, модификаторы, газы термолиза, дистиллятные фракции, газовая и газожидкостная хроматография

Keywords: petroleum products, modifiers, thermolysis gases, distillate fractions, gas and gas-liquid chromatography

В настоящее время для рационального использования и большего извлечения топлив из тяжелых нефтяных остатков (ТНО) актуально применять современные технологии, связанные с использованием различных химических добавок при воздействии повышенных температур и давлений. В процессе термолиза тяжелые нефтяные системы претерпевают ряд превращений, которые приводят к получению легких продуктов (газа, бензиновой и дизельной фракции, жидкого остатка термолиза) и твердого кокса [1-4].

Цель исследования – оценить состав и качество газообразных и жидких продуктов термолиза нефтяных остатков, в том числе в присутствии модифицирующих химических добавок, используя хроматографические методы.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали тяжелый нефтепродукт – битум марки БНК-90/30, который модифицировали 1 мас. % следующих добавок: метил-бис-олеилэтил-2-гидроксиэтиламмоний метосульфат (ЭЧАС) и этилендиамин тетра-бис-этоксилат-блок-пропоксилат-тетрол (ОЭ-ОП)-ЭДА.

Термолиз нефтяных образцов проводили в автоклаве Parr 4843, при этом максимальное давление достигало 2,9–3,2 МПа, а максимальная температура составляла 415–420 °С. Газообразные продукты анализировали методом газовой хроматографии на хроматографе Цвет-800 с детектором по теплопроводности (стальная насадочная колонка, 1 м × 3 мм, цеолит NaX, газ-носитель – гелий). Концентрации компонентов в газах термолиза рассчитывали методом внутренней нормализации [5].

В результате исследования также получены жидкие фракции с соответствующими температурами кипения, приведенными к атмосферному давлению – бензиновая ($T < 200$ °С), дизельная (200 – 350 °С) фракции и остаток термолиза ($T > 350$ °С). Анализ бензиновой и дизельной фракций проведен методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Кристалл-5000.2 с пламенно-ионизационным детектором (капиллярная колонка Rtx-2887 Restek (10 м × 0,53 мм × 2,65 мкм), газ-носитель – водород). Для расшифровки хроматограмм применялся пакет анализа Unichrom SimDis [3].

Результаты исследования и их обсуждение. В результате определения материального баланса процесса термолиза нефтяных образцов (таблица 1) установлено, что при использовании ЭЧАС выход газа не изменяется, а (ОЭ-ОП)-ЭДА приводит к уменьшению содержания газообразных продуктов на 1,1 %. Исследуемые модификаторы увеличивают суммарный выход жидких фракций и снижают коксообразование.

Таблица 1 – Материальный баланс термоллиза нефтяных образцов

Фракции	Выход, мас. %		
	ТНО	ТНО + ЭЧАС	ТНО + (ОЭ-ОП)-ЭДА
газ	7,7	7,7	6,6
жидкие фракции:	62,8	66,1	71,1
-бензиновая фракция	17,9	19,2	17,0
-дизельная фракция	20,4	20,2	21,6
-жидкий остаток термокрекинга	24,5	26,7	32,5
кокс	29,5	26,2	22,3

Полученные в результате термоллиза газы перспективны к использованию в качестве нефтехимического сырья или топлива. Для них на рисунке 1 приведен пример хроматограммы, полученной на хроматографе Цвет-800, а их состав представлен в таблице 2.

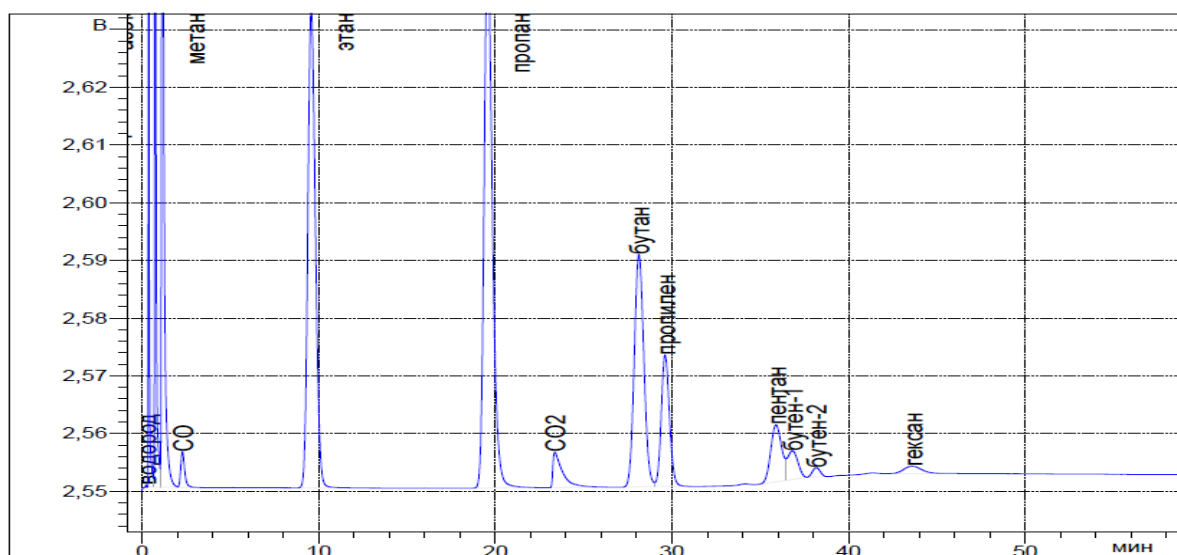


Рисунок 1 – Пример хроматограммы газов термоллиза

Таблица 2 – Результаты хроматографического анализа газов

Состав фракции	ТНО	ТНО + ЭЧАС	ТНО + (ОЭ-ОП)-ЭДА
алканы ($\text{CH}_4 \div \text{C}_6\text{H}_{14}$)	74,966	74,169	74,347
алкены ($\text{C}_2\text{H}_4 \div \text{C}_4\text{H}_8$)	22,542	23,297	22,217
H_2	1,064	0,925	1,251
CO	0,912	0,989	1,711
CO ₂	0,516	0,621	0,475

Как видно из данных таблицы 2, в составе газа преобладают алканы и алкены с максимальным содержанием этана и этилена за счет расщепления

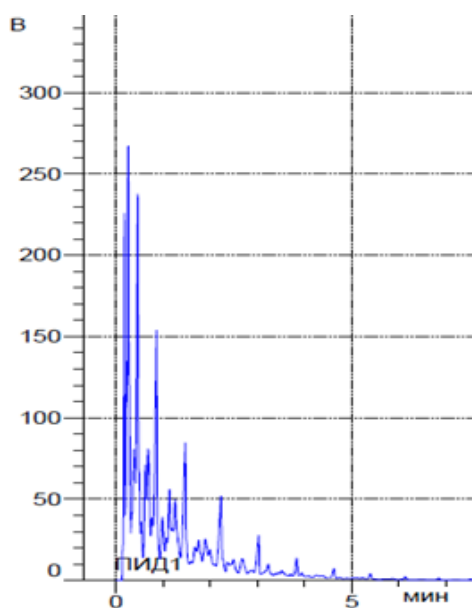
и диспропорционирования углеводородных радикалов во время термолиза. Во всех исследуемых системах содержание СО превышало концентрацию СО₂, особенно в случае композиции с (ОЭ-ОП)-ЭДА в 3,4 раза, что, вероятно, свидетельствует о деоксигенации кислородсодержащих карбонильных и эфирных функциональных групп, которые присутствуют в добавках.

Относительно дистиллятных фракций следует отметить, что ЭЧАС увеличивает выход бензиновой фракции, а (ОЭ-ОП)-ЭДА – дизельной, кроме того, обе исследуемые добавки повышают образование жидкого масляного остатка термолиза, который можно использовать как сырье для каталитического крекинга и производства технического углерода или как котельное топливо [3].

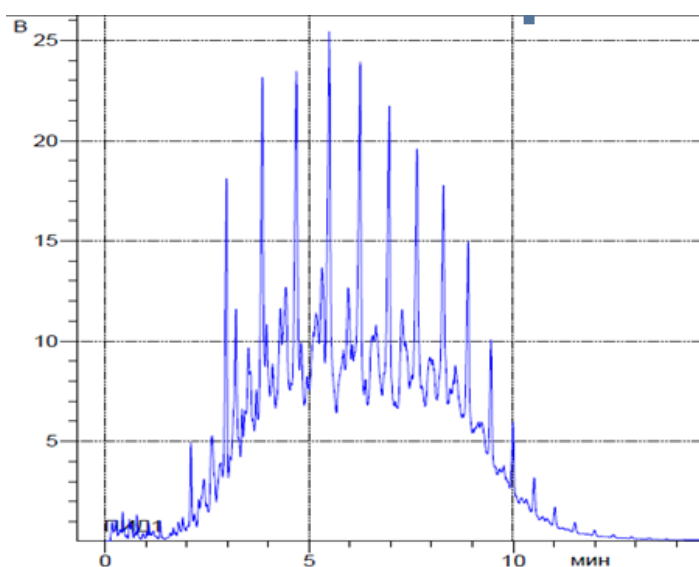
Для обеспечения качества нефтепродуктов, проведения экспертизы топлив и определения их соответствия нормативным документам, управления процессами нефтепереработки и предсказания физических свойств было необходимо узнать пределы их кипения.

В связи с этим полученные бензиновая и дизельная фракции были проанализированы, используя хроматографический метод с имитированной дистилляцией, который моделирует процесс разгонки нефтепродукта по истинным температурам кипения. При этом индивидуальные компоненты образца элюируются из колонки в порядке возрастания их температур кипения, что позволяет проводить анализ нефтяных продуктов быстрее и с большей степенью точности, затрачивая меньшее количество анализируемых веществ. При этом заранее проводится калибровка системы по эталонной смеси углеводородов с известными температурами кипения. В результате получены хроматограммы для бензиновых и дизельных продуктов, а также кривые имитированной дистилляции (корреляция STP 577), пример которых приведен на рисунке 2.

По полученным зависимостям температуры кипения от объемного процента отгона фракции была получена информация о распределении по температурам кипения дистиллятных фракций. При этом установлено, что введение добавок в ТНО приводит к некоторому изменению фракционного состава жидких топлив: они снижают температуры кипения легких фракций бензина приблизительно на 16,7 °С, улучшая тем самым пусковые свойства топлива, поскольку для пуска холодного двигателя необходимо, чтобы 10 % бензина выкипало при температуре не выше 55 °С (зимний сорт) и 70 °С (летний). Рабочую фракцию бензина нормируют 50 %-ной точкой кипения, поэтому в связи с тем, что исследуемые добавки понижают ее на 9 °С, можно сделать вывод, что получается бензин более однородного состава, что приведет к более устойчивой работе двигателя и лучшей приемистости.

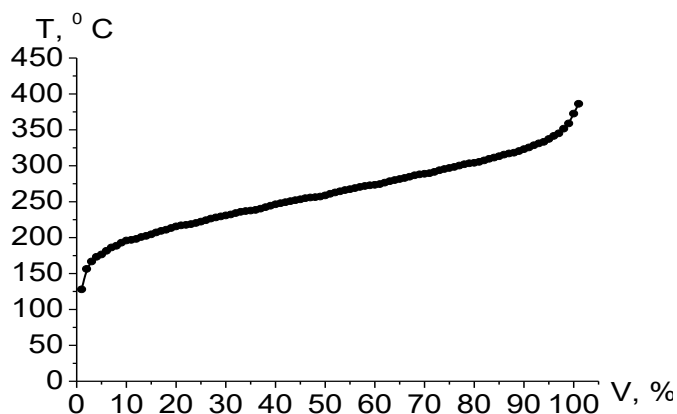


а



б

Рисунок 2. – Примеры хроматограмм дистиллятных продуктов: бензиновая (а) и дизельная фракции (б); кривая имитированной дистилляции топлива (в)



в

Для дизельной фракции применение модификаторов приводит к повышению температур кипения, в основном, во всем исследуемом диапазоне. Фракционный состав для полученных образцов дизельного топлива по температуре перегонки 50 об. % и 96 об. % фракции полностью соответствует нормативным требованиям для сорта летнего дизтоплива, для которого установлены ограничения температуры кипения не выше 280 °С и 360 °С [3].

Выводы. Применение химических модификаторов оказывает положительное эффект на процесс термических превращений ТНО, которое заключается в увеличении выхода жидких продуктов на 3,3-8,3 %, улучшении качества дистиллятных фракций и снижении коксообразования на 3,3 – 7,2 %, при этом (ОЭ-ОП)-ЭДА сильнее повышает конверсию нефтяных остатков в низкомолекулярные продукты, чем ЭЧАС.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении исследований к.х.н. Юсевичу А.И. (БГТУ) и Малевичу Н.Н.

Список литературы

1. Белянин Б.В., Эрих В.Н. Технический анализ нефтепродуктов и газа. Л.: Химия, 1970. 336 с.
2. Бойко Е.В. Химия нефти и топлив. Ульяновск: УЛГТУ, 2007. 60 с.
3. Крутько Н.П. [и др.] Влияние ПАВ на термокрекинг тяжелого нефтяного сырья // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. 2014. № 3. С. 94-98.
4. Химия нефти и газа / под ред. В.А.Проскурякова, А.Е. Драбкиной. СПб : Химия, 1995. 448 с.
5. Царев Н.И., Царев В.И., Катраков И.Б. Практическая газовая хроматография. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2000. 156 с.

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

АВЕРЬЯНОВА Е.В.
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ПОЛИФЕНОЛОВ ОБЛЕПИХОВОГО ШРОТА

*Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», г. Бийск
e-mail: averianova.ev@bti.secna.ru*

AVERYANOVA E.V.
COMPARATIVE CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS
OF SEA BUCKTHORN MEAL POLYPHENOLS

*Biysk Technological Institute (branch)
of the Altay State Technical University, Biysk
e-mail: averianova.ev@bti.secna.ru*

Аннотация: В работе методом обращено-фазовой ВЭЖХ приведен сравнительный анализ качественного и количественного состава полифенольного комплекса, извлеченного из обезжиренного облепихового шрота, без применения предварительной обработки сырья и обработанного мультиэнзимной композицией Брюзайм ВГХ и Ультрафло XL.

Abstract: In this work, the method of reversed-phase HPLC provides a comparative analysis of the qualitative and quantitative composition of the polyphenolic complex extracted from fat-free sea buckthorn meal, without the use of pretreatment of raw materials and treated with a multi-enzyme composition Bruzime ВГХ and Ultraflo XL.

Ключевые слова: флавонолы, облепиховый шрот, предобработка, ферментализ, ВЭЖХ анализ

Keywords: flavonols, sea buckthorn meal, pretreatment, fermentolysis, HPLC analysis

Цель исследования. Методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) провести сравнительный анализ качественного и количественного состава суммы флавоноидов, выделенного из нативного обезжиренного облепихового шрота и сырья, предварительно обработанного ферментным препаратом.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись: обезжиренный облепиховый шрот с содержанием веществ полифенольной природы $4,0 \pm 0,5$ %; экстракты и гидролизаты суммы флавоноидов, полученные из обезжиренного облепихового шрота; стандартные образцы (ГСО) флавоноидов: изорамнетин, кверцетин, кемпферол, рутин; мультиэнзимная композиция коммерческих ферментных препаратов Брюзайм ВГХ и Ультрафло XL в соотношении 1 : 1. Суммарное количественное содержание флавоноидов в экспериментальных образцах определяли методом Фолина-Чокальтеу с использованием

спектрофотометра «*Shimadzu UV-1800*», идентификацию флавоноидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с фотометрическим детектированием на приборе «*Waters 2695 Alliance*», определение концентрации редуцирующих веществ проводили методом Бертрана.

Результаты исследования и их обсуждение. В составе обезжиренного облепихового шрота содержание веществ фенольной природы, определенных спектрофотометрически, составляет от 3,5 % до 4,5 % и зависит от срока сбора, места заготовки сырья, продолжительности хранения и технологических режимов получения целевых продуктов. Методом ВЭЖХ установлено, что полифенольный комплекс облепихового шрота представлен главным образом флавонолами (изорамнетин, кемпферол, кверцетин) и флавоногликозидом рутином, проявляющими антиоксидантную и Р-витаминную активность, которая выражается в укреплении стенок капилляров, снижении их ломкости и проницаемости [2, 5].

В предлагаемом исследовании рассмотрен способ выделения полифенольного комплекса из обезжиренного облепихового шрота, основывающийся на экстракции сырья этиловым спиртом и показано, что предварительная обработка шрота гидролитическими ферментами способствует повышению выхода полифенолов на 13%, за счет разрушения связей полифенол-субстратного комплекса, без изменения соотношения полифенолов в извлекаемом комплексе [1].

Для более полной и глубокой конверсии полисахаридов облепихового шрота используют мультиэнзимную композицию ферментных препаратов Брюзайм ВГХ и Ультрафло XL (в соотношении 1 : 1) [4], что объясняется синергетическим эффектом, который проявляется во взаимном усилении их действия, увеличении скорости гидролитического расщепления растительных полисахаридов, выражающийся в интенсификации процесса разрушения клеточной стенки и облегчении последующей экстракции комплекса флавоноидов из разрушенных клеток, что подтверждается микроскопическим анализом облепихового шрота до и после ферментализации (рис.1).

В результате предварительной обработки в составе ферментализата облепихового шрота идентифицированы следующие моносахариды: глюкоза, галактоза, манноза, ксилоза, арабиноза, рамноза. По наличию моносахаридов, образованных в результате гидролиза, можно сделать вывод о том, что полисахариды облепихового шрота представлены такими полисахаридными макромолекулами как арабиногалактаны, арабиноманнаны, арабиноксиланы, глюкоарабинаны. Также можно предположить наличие гликозидов: изорамнетин-3-рамнозид, изорамнетин-3-О-глюкозид, изорамнетин-3-О-глюкозид-7-о-рамнозид, кверцетин-3-рутинозид-7-рамнозид и кверцетин-3-О-глюкозид.

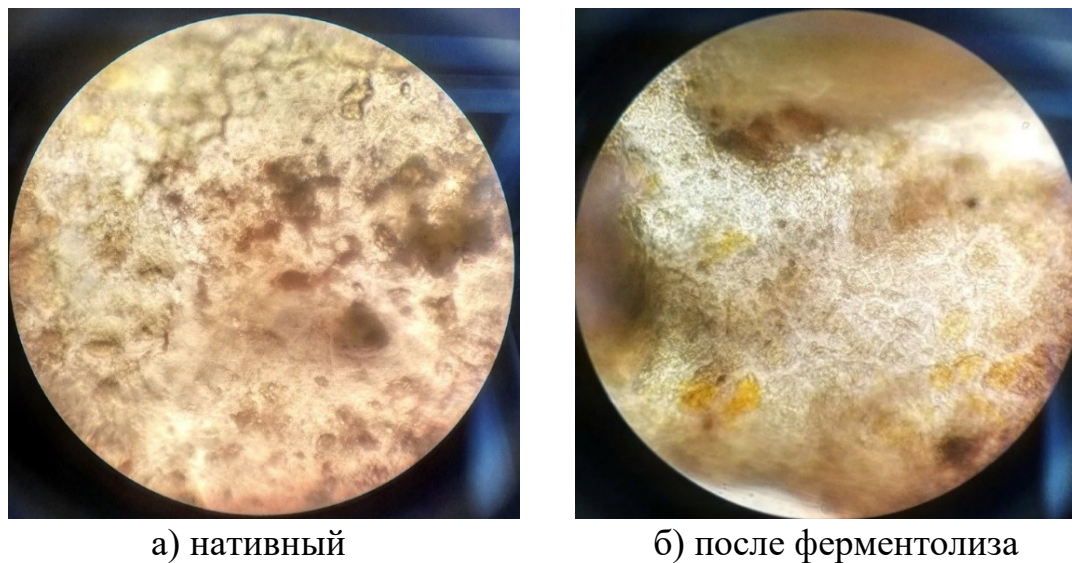


Рисунок 1 – Микроскопический анализ облепихового шрота ($\times 600$)

Нативный и предварительно гидролизованный облепиховый шрот подвергали исчерпывающему экстрагированию этиловым спиртом в аппарате Сокслета, полученную вытяжку упаривали под вакуумом досуха и подвергали хроматографическому анализу. Условия хроматографического анализа для определения рутина: октадецилсиликагель, Symmetry C 18, размер колонки $250 \times 4,6$ мм, размер частиц 5 мкм. Скорость подачи элюента $1,0 \text{ см}^3/\text{мин}$. Детектирование: УФ, $\lambda = 360 \text{ нм}$; объем вводимой пробы: 10 мм^3 , подвижная фаза: трихлоруксусная кислота, $\text{pH} = 2,5 - 70 \%$, ацетонитрил – 30% [3]. Расчет содержания индикаторных компонентов проводили по градуировочному графику, построенному в координатах S (площадь пика) – C (концентрация), г/100 г. Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в составе комплекса флавоноидов облепихового шрота обнаружены рутин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин, содержание которых представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Химический состав комплекса флавоноидов обезжиренного облепихового шрота

Наименование соединения	Содержание, %		Изменение содержания, %
	без предобработки	с предобработкой	
Рутин	18,35	17,82	2,89↓
Кверцетин	31,17	31,70	1,70↑
Кемпферол	2,29	2,16	5,68↓
Изорамнетин	48,19	48,32	0,27↑

Согласно данным таблицы ферментализ сырья (шрота) несущественно влияет на соотношение флавоноидов в составе их комплекса. Так, наблюдается увеличение содержания изорамнетина (0,27 %) и кверцетина (1,70 %), и снижение содержания рутина (2,89 %) и кемпферола (5,68 %), что вероятно связано с разрушением гликозидных связей в фенолгликозидах.

Выводы. Качественный и количественный состав полифенольного комплекса облепихового шрота изучен методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, в результате которого в экстракте установлено, что доминирующими веществами являются кверцетин и изорамнетин, антиоксидантная активность которых более чем в 1,5 раза превосходит принятый за эталон – рутин. В связи с этим экстракты, полученные из облепихового шрота, могут стать альтернативной заменой рутину в фармацевтической промышленности и производстве БАД, и в целом повысят конкурентоспособность российских производителей на фармацевтическом рынке.

Список литературы

1. Averyanova E.V., Shkolnikova M.N., Chugunova O.V. Plant raw materials prehydrolysis efficiency in bioflavonoid technology // International Conference on Food Science and Biotechnology (FSAB 2021) – AIP Conference Proceedings 2419. – 2021. – P. 020014-1–020014-5. doi.org/10.1063/5.0068585.
2. Gupta S.M., Gupta A.K., Ahmed Z. and Kumar A. Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) Plant Extracts Show Potential Antimicrobial Activity // Seabuckthorn (*Hippophae L.*) A multipurpose Wonder Plant. – 2014. – Vol. 4. – P. 393-401
3. Канунникова Ю.С., Джавахян М.А. Определение флавоноидов в траве Володушки золотистой (*Herba Vupleuri aurei*) методом ВЭЖХ // Новые задачи современной медицины – 2013. – С. 88-90.
4. Способ получения комплекса биофлавоноидов из обезжиренного облепихового шрота // Патент России № 2711728. 2020. Бюл. № 3. / Аверьянова Е.В., Школьникова М.Н., Малахова А.В. [и др.].
5. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. – Пущино: Synchronobook, 2013. – 310 с.

¹АДАМОВА А.А., ^{1,2}ГЕНЕРАЛОВА Ю.Э.

**ПОДБОР ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ДЛЯ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАФАМИДИСА**

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический
университет, г. Санкт-Петербург

²Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург
e-mail: Generalova.Yuliya@pharminnotech.com

¹ADAMOVA A.A., ^{1,2}GENERALOVA Y.E.

**SELECTION OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS FOR ASSAY
OF TAFAMIDIS**

¹Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg

²ITMO University, Saint-Petersburg
e-mail: Generalova.Yuliya@pharminnotech.com

Аннотация: в работе проводится подбор хроматографических условий определения тафамидиса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – подбор растворителя, выбор состава подвижной фазы, способа элюирования.

Abstract: the objective of this study was a selection of chromatographic conditions for determination of tafamidis by HPLC, that is, correct selection of solvents, composition of mobile phase and elution mode.

Ключевые слова: тафамидис, ВЭЖХ, хроматографические условия, хроматографическое поведение, лекарственные средства

Keywords: tafamidis, HPLC, chromatographic conditions, chromatographic behavior, drugs

Цель исследования. Подобрать оптимальные хроматографические условия, пригодные для количественного определения тафамидиса методом ВЭЖХ.

Материалы и методы исследования. Объект исследования – субстанция-порошок тафамидиса (2-(3,5-дихлорфенил)-1,3-бензоксазол-6-карбоновая кислота). Основные характеристики соединения: молярная масса 308,12 г/моль, растворимость в ДМСО 5 мг/мл, значения длин волн при максимумах в спектре поглощения - 214, 301, 310, 324 нм [2].

Используемое оборудование:

- аналитические весы САРТОГОСМ СЕ224-С (ООО «Сартогосм», Россия);
- спектрофотометр Shimadzu UV-1240 mini (Shimadzu, Япония);
- хроматограф жидкостной Миллихром-А02, оснащенный ультрафиолетовым детектором (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия);
- хроматографическая колонка Prontosil 120-5, С18, 75×2 мм (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия).

ВЭЖХ проводилась в соответствии с требованиями соответствующей статьи в Фармакопее XIV издания [1]. Анализ литературных источников показал, что все описанные методики хроматографирования тафамидиса отличаются друг от друга составом подвижной фазы и способами детектирования, но общим сходством является использование обращено-фазового сорбента С18, на котором и проводилось разделение аналита. При подборе состава подвижной фазы хроматографические параметры были следующие:

- колонка 75×2 мм, заполненная сорбентом Prontosil C18, 5 мкм;
- термостат колонки 40°C;
- ПФ В – ацетонитрил;
- скорость потока – 0.1 мл/мин;
- объём вводимой пробы – 5 мкл;
- длины волн детектора – 230, 270, 310 нм.

Результаты исследования и их обсуждение. Предварительные исследования тафамидиса показали, что единственным доступным растворителем является ДМСО. Для записи спектра навеску тафамидиса 4,7 мг растворили в 10,0 мл ДМСО. Полученный раствор разбавили водой до концентрации 9,4 мкг/мл, для которого записали спектр в диапазоне длин волн 210–320 нм. ДМСО имеет собственное поглощение в коротковолновой области спектра, поэтому для тафамидиса наблюдается один максимум, которому соответствует длина волны излучения 308,0 нм, значение величины оптической плотности 0,314 и коэффициент экстинкции 10 295 моль⁻¹·л·см⁻¹.

Анализ проводили для исходного раствора тафамидиса в ДМСО, разбавленного в 100 раз водой, меняя природу ПФ А и соотношение компонентов в элюенте. Запись хроматограмм проводили при трех длинах волн: 230 нм (для детектирования выхода ДМСО), 270 нм и 310 нм (специфичная величина для тафамидиса).

В первую очередь выбрали природу ПФ А. Результаты проведенных измерений приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Хроматографические параметры пика при выборе природы ПФ

ПФ А (соотношение с ацетонитрилом 50:50)	t _r , мин	As
0,5% уксусная кислота рН 3,12	> 10 мин	-
Вода	=t _m (1,5 мин)	-
Фосфатный буферный раствор рН 6,92	3,05	1,45
Фосфатный буферный раствор рН 6,85	3,09	1,31
Фосфатный буферный раствор рН 6,75	3,37	1,27

Кислые значения pH приводят к полному подавлению диссоциации молекулы, в результате чего она очень прочно удерживается на обращено-фазном сорбенте, для ее десорбции необходимо использование ПФ с высоким процентным содержанием ацетонитрила, что приводит к частичному размытию хроматографической зоны и увеличению асимметрии пика. Вода не имеет ионную силу, поэтому при её использовании аналит не удерживается на сорбенте. При использовании ПФ с pH около 7 достигаются оптимальные характеристики удерживания. При pH 6,85 наблюдается наилучшее время удерживания и удовлетворительная асимметрия пика, поэтому данный буферный раствор рекомендуется к использованию в дальнейшей работе.

Вторым этапом подбора ПФ стал выбор соотношения компонентов ПФ А и В. Результаты определения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Хроматографические параметры пика при выборе соотношения компонентов ПФ

ПФ А/ ПФ В	t_r , мин	N	As
Фосфатный буферный раствор pH 6,85 / CH ₃ CN (60/40)	5,28	4009	1,52
Фосфатный буферный раствор pH 6,85 / CH ₃ CN (50/50)	3,14	3858	1,40
Фосфатный буферный раствор pH 6,85 / CH ₃ CN (40/60)	2,41	3143	1,44

Результаты анализа показывают сопоставимые значения фактора асимметрии, но оптимальные значения времён удерживания достигаются при содержании в ПФ 50% ацетонитрила. Типичная хроматограмма при использовании подвижной фазы, содержащий фосфатный буферный раствор pH 6,85 и ацетонитрил в соотношении 50:50 представлена на рисунке.

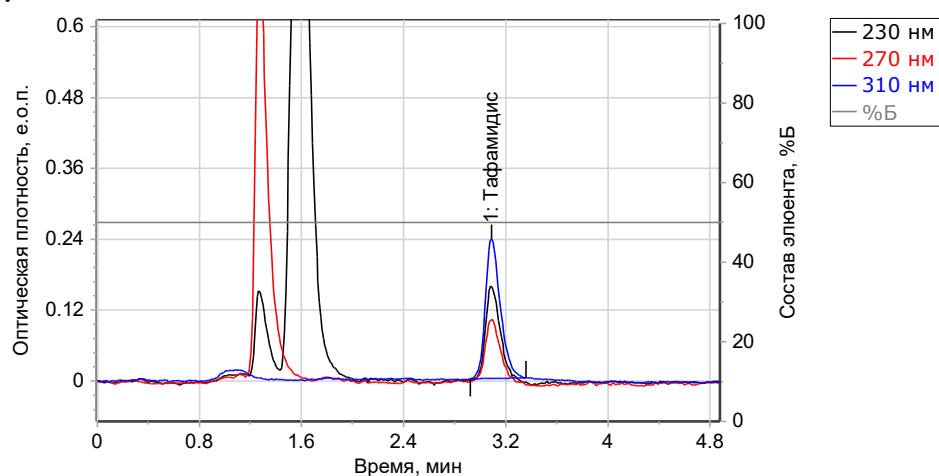


Рисунок 1 – Хроматограмма раствора тафамидиса в оптимальных хроматографических условиях

Выводы. Таким образом, для единичного анализа без потери эффективности разделения в качестве подвижной фазы может быть выбрана смесь фосфатного буферного раствора рН 6,85 и ацетонитрила в соотношении 50/50, термостат колонки 40°C, скорость потока – 0,1 мл/мин, длина волны детектора – 310 нм.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.1. – Москва. – 2018. – 1470 с.
2. Cayman Chemical [Internet] URL: <https://www.caymanchem.com/product/13694>

¹АЛЕКСЕЕВ Е.Ю., ²КОЧУРОВА Е.В.

ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА ВОДЫ НА ПРОЦЕНТ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ДИФЛУБЕНЗУРОНА ИЗ СУХОЙ ПОЧВЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПО МЕТОДУ QUECHERS В СОЧЕТАНИИ С ВЭЖХ-УФ АНАЛИЗОМ

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений", Санкт-Петербург, г. Пушкин

² ООО "Инновационный центр защиты растений", Санкт-Петербург, г. Пушкин
e-mail: anscreation@yandex.ru

¹ALEXEEV E.Yu., ²KOCHUROVA E.V.

INFLUENCE OF THE AMOUNT OF WATER ON THE PERCENTAGE OF DIFLUBENZURON RECOVERY FROM DRY SOIL WHEN USING SAMPLE PREPARATION ACCORDING TO THE QUECHERS METHOD IN COMBINATION WITH HPLC-UV ANALYSIS

¹Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Research Institute for Plant Protection", St. Petersburg, Pushkin

² Ltd. "Innovation Center of Plant Protection", St. Petersburg, Pushkin
e-mail: anscreation@yandex.ru

Аннотация: Метод пробоподготовки QuEChERS на сегодняшний день, является одним из самых быстрых и удобных методов пробоподготовки в мире для анализа остаточных количеств пестицидов. Эффективность данного метода пробоподготовки зависит от влажности исследуемого объекта. На примере дифлубензурана было показано, как

изменение влажности анализируемого объекта влияет на экстракцию действующего вещества.

Abstract: The QuEChERS sample preparation method is currently one of the fastest and most convenient sample preparation methods in the world for the analysis of pesticide residues. The effectiveness of this method of sample preparation depends on the moisture content of the object under study. Using diflufenzuron as an example, it was shown how a change in the moisture content of an analyzed object affects the extraction of an active substance.

Ключевые слова: ВЭЖХ, дифлубензурон, пестициды, остаточные количества, QuEChERS

Keywords: HPLC, diflufenzuron, pesticides, residues, QuEChERS

Аналитический обзор. Для защиты урожая от вредителей, аграрии активно пользуются пестицидами. Одним из основных условий, предъявляемых к продукции, является её безопасность. Несмотря на преимущества использования пестицидов, их интенсивное и повсеместное использование, помимо накопления остаточных количеств в самой продукции, может привести к увеличению загрязнения почвы, тем самым увеличивая риски для окружающей среды и здоровья потребителя. В результате использования пестицидов более двух миллионов человек, в основном проживающих в развивающихся странах, подвергаются повышенному риску для здоровья [1].

В связи с этим разрабатываются регламенты безопасного применения пестицидов, которые сопровождаются системой мониторинга остаточных количеств действующих веществ. Поэтому необходимы разработанные методы анализа остаточных количеств пестицидов.

Одним из самых сложных этапов, при разработке методики определения остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды и сельскохозяйственных культурах является пробоподготовка. Быстрым и удобным методом пробоподготовки является метод QuEChERS. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe - Быстро, Просто, Дёшево, Эффективно, Надежно и Безопасно) - быстрый и эффективный метод, позволяющий извлекать из проб остаточные количества целевых соединений, удаляя нежелательные помехи, такие как органические кислоты, липиды, пигменты, сахара и другие [4]. Метод QuEChERS лишён таких недостатков традиционных методов пробоподготовки, как длительность процедуры извлечения, использование опасных растворителей, и радикально упрощает анализ остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах.

Пробоподготовка сухих матриц, например сухой почвы или же зерна, часто вызывают затруднения. Из-за низкой влажности исследуемой матрицы, на стадии первичной экстракции, растворитель может впитаться в саму пробу, как следствие, привести к невозможности отбора аликвоты для

стадии очистки. Также соли, которые используют для повышения экстрактивности, из-за низкого содержания влаги могут потерять эффективность. Как следствие, уменьшается процент извлечения вещества и снижается точность анализа. Преодолеть данную проблему можно либо уменьшив количество образца, либо добавив воду. В первом случае уменьшается чувствительность метода анализа и предел обнаружения, что может быть недопустимо для некоторых действующих веществ. Поэтому добавление воды является более рациональным путём, который чаще всего используется исследователями [2,3].

Существуют общие рекомендации по добавлению необходимого количества воды в зависимости от влажности матрицы [5]. Однако, исследование зависимости процента извлечения действующих веществ от количества добавляемой воды в сухую почву или другую сухую матрицу в литературе найдено не было.

Цель исследования. Показать на примере дифлубензурана о влиянии количества воды на процентный выход действующего вещества в почве, а также подобрать количество воды для достижения оптимального процента извлечения.

Материалы и методы исследования.

Условия пробоподготовки. Пробоподготовка методом QuEChERS для извлечения дифлубензурана из почвы: навеску почвы (10 г) помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку вместимостью 50 см³, последовательно добавляют 10 см³ ацетонитрила, 4 г безводного сульфата магния, 1 г хлористого натрия, 1 г лимоннокислого натрия трехзамещенного 2-водного и 0,5 г лимоннокислого натрия двухзамещенного 1,5-водного. Пробирку плотно закрывают и помещают в перемешивающее устройство на 10 мин, затем центрифугируют в течение 10 мин при скорости 4000 об./мин. От верхнего ацетонитрильного слоя отбирают 5 см³, переносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см³, содержащую 150 мг сорбента для твердофазной экстракции на основе первичного-вторичного амина (PSA) и 900 мг безводного сульфата магния. Пробирку плотно закрывают и помещают в перемешивающее устройство на 10 мин, затем центрифугируют в течение 10 мин при скорости 4000 об./мин. От верхнего слоя отбирают 2 см³ (аликвота, соответствующая 2 г) и упаривают досуха в токе воздуха при температуре не более 40 °С.

Условия хроматографирования. Ультразэффективный жидкостной хроматограф Waters Acquity I-class с УФ-детектором, аналитическая колонка, заполненная сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами ВЕН С-18 (100 x 2,1) мм, 1,7 мкм. Температура колонки (30 ± 1) °С. Подвижная фаза: смесь ацетонитрила и воды в соотношении 45:55 по объёму. Скорость потока элюента 0,2 см³/мин. Рабочая длина волны УФ-детектора 270 нм. Объем вводимой пробы 10 мм³.

Результаты исследования и их обсуждение. Почва предварительно была высушена, при температуре 60 °С в сушильном шкафу. Было решено добавить следующие количества воды на 10 г сухой почвы: 3, 5, 10 и 12 см³ H₂O.

В остальном, метод пробоподготовки, описанный в разделе методы исследования, остался без изменений. Результаты представлены в виде диаграммы на рисунке 1.

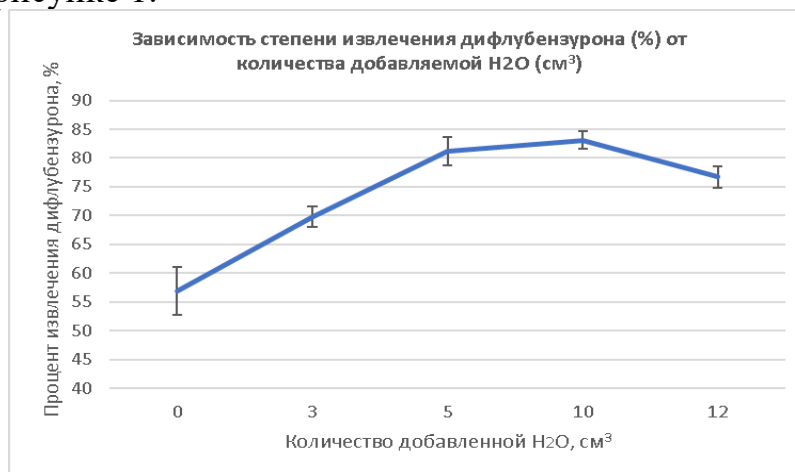


Рисунок 1 – График зависимости степени извлечения дифлубензурана (%) от количества добавляемой H₂O (см³)

Как видно из полученных результатов, влажность пробы непосредственно влияет на извлечение исследуемого вещества. Достижение высокого (75% и более) процента извлечения наблюдается уже при использовании 5 см³ воды. Добавление более 10 см³ воды привело к небольшому уменьшению экстрактивности метода. Переизбыток воды в матрице может, наоборот, привести к понижению эффективности экстрактивных солей.

Выводы. Таким образом, была установлена зависимость степени извлечения дифлубензурана от влажности почвы. Исходя из полученных результатов, можно рекомендовать добавлять воду из расчёта на 1 г сухой почвы 0,5–1 см³ воды. В целом, данную рекомендацию можно дать и для других действующих веществ, так как в данном случае изменение влажности пробы больше влияет на эффективность действия экстрактивных солей. Но стоит отметить, это возможно только если исследуемое действующее вещество обладает растворимостью в воде ниже, чем в ацетонитриле. Добавление воды для увеличения экстракции действующих веществ пестицидов потенциально может быть эффективно и для других сухих объектов исследования, таких как мука, соя, пшеница, солома и т.д.

Список литературы

1. "Agricultural Pesticides and Human Health." https://serc.carleton.edu/NAGTWorkshops/health/case_studies/pesticides.htm

(accessed Jun. 01, 2021).

2. C. Díez, W. A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, and J. Atienza, “Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and ‘dispersive solid-phase extraction’ method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1131, no. 1–2, pp. 11–23, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.07.046.

3. I. R. Pizzutti *et al.*, “Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1142, no. 2, pp. 123–136, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2006.12.030.

4. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, and F. J. Schenck, “Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and ‘dispersive solid-phase extraction’ for the determination of pesticide residues in produce,” *J. AOAC Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 412–431, 2003, doi: 10.1093/jaoac/86.2.412.

5. M. Anastassiades *et al.*, “Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement,” *Eurl-Srm*, 2020. [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPe_PO_V11\(1\)](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPe_PO_V11(1)).

АРТАМОНОВ И.В.

**ОСОБЕННОСТИ РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ
МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С
ПОСТКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИЕЙ НИНГИДРИНОМ**

*Вологодский научный центр РАН, г. Вологда
e-mail: iv.artamonov@outlook.com*

ARTAMONOV I.V.

**FEATURES OF SEPARATION OF A MIXTURE OF AMINO
ACIDS BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY WITH POST-
COLUMN DERIVATIZATION WITH NINHYDRIN**

*Vologda Science Center of RAS
e-mail: iv.artamonov@outlook.com*

Аннотация: Анализ смесей аминокислот различного происхождения с постколоночной дериватизацией нингидрином является стандартной методикой (изложенной, например, в ГОСТ 32195-2013). В процессе работы были выявлены определенные особенности разделения проб, полученных из материалов различного происхождения. Результаты изложены в настоящей статье.

Abstract: Analysis of amino acids mixtures of various origins with post-column derivatization with ninhydrin is a standard method (described, for example, in GOST 32195-2013). Within the study we identified certain features of the separation of samples obtained from different types of materials. The results are presented in the paper.

Ключевые слова: аминокислоты, ВЭЖХ, ионообменная хроматография.

Keywords: amino acids, HPLC, ion-exchange chromatography.

Цель исследования. Цель работы – подбор оптимальных условий разделения смесей аминокислот различного (растительного, животного и др.) происхождения в конкретных условиях работы.

Рост мировой популяции ставит перед пищевой промышленностью и сельским хозяйством задачу обеспечения населения качественным пищевым белком. Эта задача существует как на общемировом уровне, так и на уровне отдельных стран, регионов и отдельных хозяйств и производств [1].

Спрос на качественный белок обусловлен, с одной стороны, потребностью поддержания роста, здоровья и, в целом, полноценной жизнедеятельности человека. С другой стороны – потребностью сельского хозяйства и других отраслей в качественном кормовом сырье и готовых кормах для поддержания высокой продуктивности сельскохозяйственных животных, служащих основным источником полноценного белка [2].

Содержание аминокислот является одним из факторов, определяющих направления коррекции рационов, а также диагностическим показателем состояния сельскохозяйственных животных. Своевременное и точное количественное определение аминокислотного состава белков в кормах позволяет скорректировать рационы введением в них как источника более полноценного белка, так и добавкой отдельных чистых аминокислот.

Материалы и методы исследования. В работе использовался диодно-матричный детектор Shimadzu SPD-M20A в сочетании с системой классической жидкостной хроматографии Shimadzu LC-20 Prominence и модулем дериватизации ARM-1000 производства Sevko. Разделение проводилось на Na-ионообменной колонке при температуре 60°C в режиме градиентного элюирования.

В качестве компонентов подвижной фазы использованы готовые буферные растворы производства Sevko: компоненты А, В – цитратные буферы с установленным показателем рН = 2,20, компонент С – раствор гидроксида натрия с рН = 11,0 для регенерации хроматографической колонки. Все растворы могут быть приготовлены самостоятельно в соответствии с ГОСТ 34230-2017. В качестве дериватирующего реагента применялся готовый нингидриновый реагент, обработанный активатором непосредственно перед началом анализа.

Калибровка хроматографической системы выполнена с использованием готового раствора стандартов аминокислот концентрацией 1 мкМ/мл. Стандартный раствор объемом 250 мкл разбавляли буфером для разведения образцов (цитратный буферный раствор с установленной рН = 2,20) вдвое. Далее половину полученного раствора переносили в отдельную виалу и разбавляли 250 мкл буфера для разведения образцов. Таким образом получили два калибровочных раствора с концентрациями 0,25 и 0,125 мкМ/мл. Калибровочные растворы вводили в хроматограф посредством автосэмплера SIL-20А, начиная с раствора с наименьшей концентрацией. Хроматограмма стандарта аминокислот представлена на *рис. 1*.

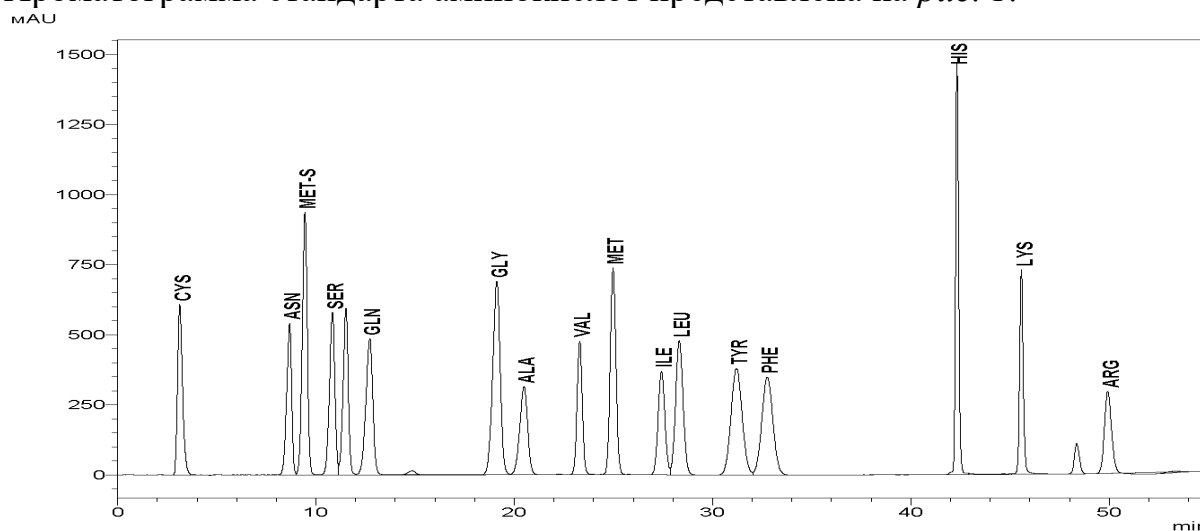


Рис. 1. Хроматограмма стандарта аминокислот, включая метионин (MET) и его окисленную форму – метионин сульфон (MET-S), длина волны – 570 нм. Пролин (PRO) регистрируется на длине волны 440 нм.

Пробоподготовка образцов травосмесей, комбикорма и мяса включала кислотный гидролиз раствором соляной кислоты с концентрацией 6М в течение 24 часов. Растительные образцы перед гидролизом высушивали до постоянной массы и измельчали до отсева на сите с ячейкой 0,5 мм.

Навеску образца (для животных образцов – 0,4 г, для растительных – 1 г) помещали в банки с винтовыми крышками и добавляли раствор для окисления (смесь H_2O_2 и $CHON$), через 1 час в банки добавляли метабисульфит натрия и заливали 6М раствором соляной кислоты, после чего помещали в сушильный шкаф при температуре 110°C на 24 часа.

После окончания гидролиза пробы нейтрализовали 7,5М раствором гидроксида натрия и доводили рН проб до значения 2,20. После этого пробы переносили в мерную колбу объемом 200 мл и доводили до метки буфером для разведения образцов.

Полученный раствор фильтровали через мембранные фильтры с порами 0,45 мкм, переносили в виалы и вводили в хроматограф посредством автосэмплера. После разделения на Na-ионообменной колонке

аминокислоты дериватизировались в модуле АРМ-1000. Дериваты регистрировались DAD-детектором.

Результаты исследования и их обсуждение. Подбор условий разделения проводился на растворе стандартов аминокислот. Процесс оптимизирован для объема ввода 100 и 50 мкл. Установлено, что при концентрации стандарта в 0,5 мкМ/мл и выше не происходит полного разделения валина, метионина, изолейцина, лейцина, тирозина и фенилаланина, а также гистидина и лизина, а времена удерживания смещаются в большую сторону (рис. 2).

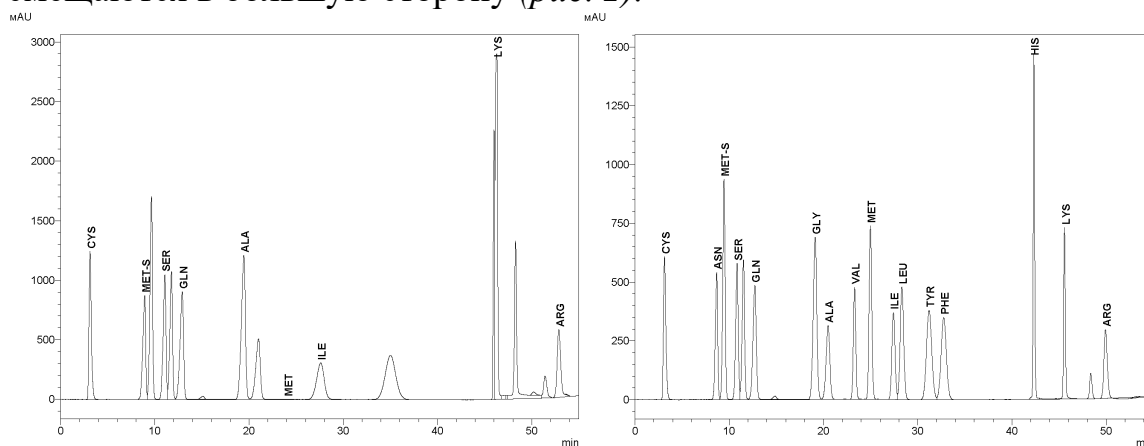


Рис. 2. Хроматограммы 0,5 мкМ/мл и 0,25 мкМ/мл калибровочных растворов аминокислот. Объем ввода – 100 мкл.

Аналогичная ситуация наблюдается при разделении аминокислот в пробах животного происхождения (рис. 3).

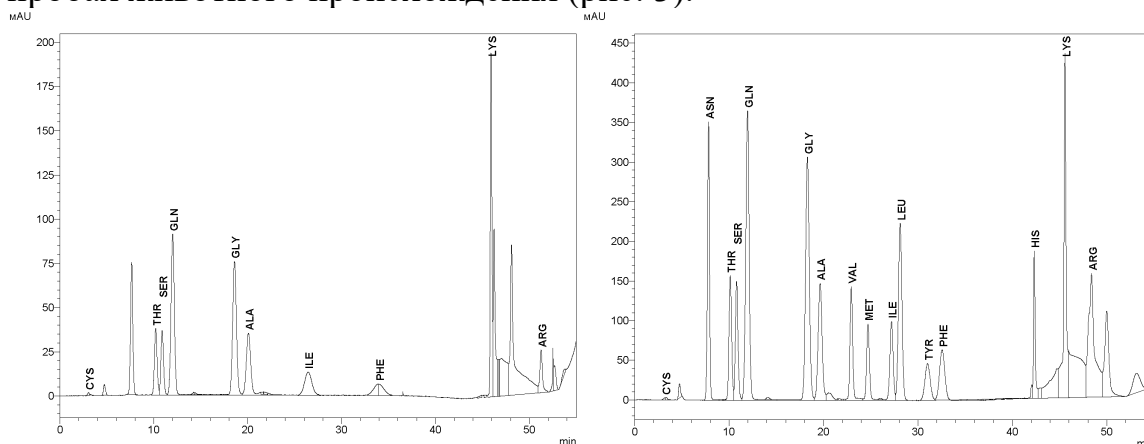


Рис. 3. Хроматограммы образцов мяса рыбы (тилапия) без разведения (1) и с двукратным разведением (2). Исходные концентрации указаны в табл. 2.

Аналогичным образом разделяются растительные образцы с высоким содержанием белка, например образцы бобовых (горох, люцерна, люпин). При двукратном разведении исходного образца, полученного из 1 грамма материала (образцы люпина и гороха), наблюдалось неполное разделение

(или отсутствие такового) пар «аспарагиновая кислота – метионин-сульфон», «изолейцин-лейцин» (рис. 4) и характерные признаки перегрузки хроматографической колонки.

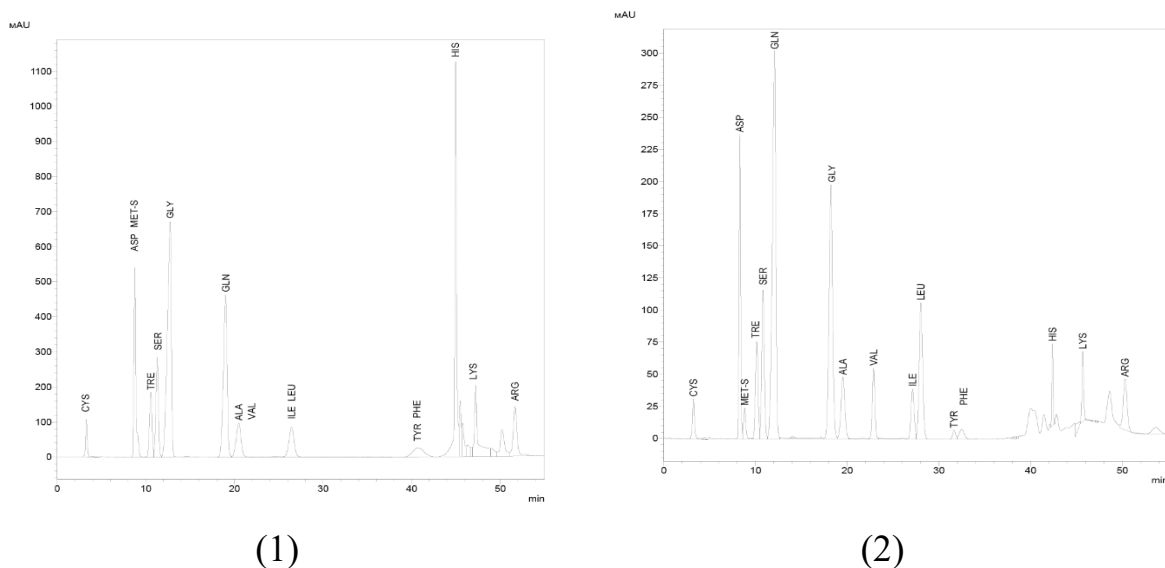


Рис. 4. Хроматограмма разделения пробы, полученной из образца семян люпина узколистного массой 1 г с разведением 1:2 (1) и 1:4 (2)

Кроме высокой концентрации аминокислот это может свидетельствовать о низкой емкости используемого типа колонок (рис. 5).

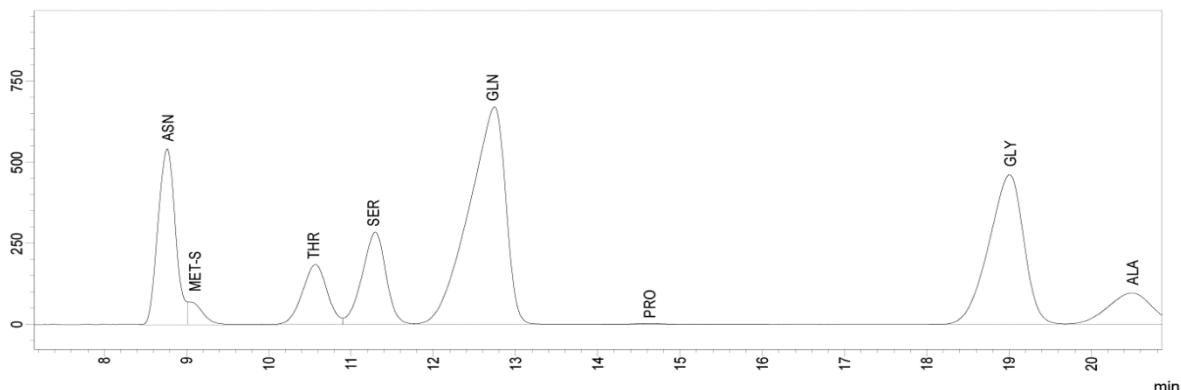


Рис. 5. Признаки перегрузки хроматографической колонки Sevko при анализе пробы с концентрацией глутамин – $\sim 0,5$ мкМоль/мл, глицина – $\sim 0,23$ мкМоль/мл

Выводы. Проведенные испытания показывают, что важной задачей при подготовке проб к анализу на содержание аминокислот в описанных условиях хроматографирования является правильная оценка концентрации аминокислот в пробе и соответствующая подготовка пробы перед вводом в хроматографическую систему.

В общем случае рекомендуется разведение проб, полученных из растительных образцов, вдвое, из животных и растительных образцов с

высоким содержанием белка (например, семена бобовых) – вчетверо для получения качественных хроматограмм.

Список литературы

1. Otter D.E. Standardised methods for amino acid analysis of food // Br. J. Nutr. 2012. Vol. 108, № SUPPL. 2.
2. Toomer O.T. et al. Feeding high-oleic peanuts to meat-type broiler chickens enhances the fatty acid profile of the meat produced // Poult. Sci. Elsevier Inc., 2020. Vol. 99, № 4. P. 2236–2245.

БАКАКИНА Ю.С., ШИНГЕЛЬ А.М., ПОХОДНЯ Е.Н.,
ПОХОДНЯ Ю.Г., СЯХОВИЧ В.Э.

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ И ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

*УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», а.г. Лесной,
Республика Беларусь
e-mail: y.bakakina@antidoping.by*

BAKAKINA Y.S., SHYNHEL A.M., PAKHADNIA E.N.,
PAKHADNIA Y.G., SYAKHOVICH V.E.

CHARACTERISTIC OF THE ANABOLIC STEROIDS METABOLIC PROFILE USING CELL ENGINEERING AND LIQUID CHROMATO-MASS SPECTROMETRY METHODS

*National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus
e-mail: y.bakakina@antidoping.by*

Аннотация. Определение анаболических андрогенных стероидов (ААС) относится к приоритетному направлению в допинг-контроле. ААС в большинстве своем практически полностью биотрансформируются в организме человека, образуя в результате серию метаболитов. В связи с этим, получение информации о путях метаболизма ААС является неотъемлемой частью разработки методов их детекции.

Abstract. Detection of anabolic androgenic steroids (AAS) is a priority area in doping control. Most AAS are almost completely biotransformed in the human body, resulting into metabolites production. Thereby, obtaining information about the pathways of AAS metabolism is an integral part of the development of methods for their detection.

Ключевые слова: модельная система *in vitro*, гепатоциты, фибробласты, синтетические анаболические андрогенные стероиды, метаболиты, хромато-масс-спектрометрия.

Keywords: *in vitro* model system, hepatocytes, fibroblasts, synthetic anabolic-androgenic steroids, metabolites, chromatography-mass spectrometry.

Цель исследования. Разработка подходов для характеристики метаболического профиля синтетических ААС в условиях модельных клеточных систем *in vitro* с использованием методов клеточной инженерии и жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлся метаболизм ААС в клеточной системе *in vitro*. Подготовку клеточных модельных систем, состоящих из культуры клеток гепатоцитов HepG2 и/или фибробластов, осуществляли в 12-луночных планшетах с использованием полной культуральной среды α -MEM (Minimum Essential Medium) [1]. Через 72 ч культивирования, по достижении клетками 80–85 %-ного конфлюэнтного монослоя, заменяли полную культуральную среду на бессывороточную для дальнейшего внесения тестируемых соединений [2]. Для тестирования модельных систем использовали ряд ААС в концентрации 5 мкМ. В качестве контроля использовали культуральную среду, не содержащую ААС. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях [2], [3]. Время инкубации целевых соединений в модельных системах составляло 72 ч. Количество и жизнеспособность клеток определяли с использованием автоматического счетчика клеток Cell Counter II. Анализ стандартных смесей и образцов культуральной среды осуществляли на обращенно-фазовой колонке Hypersil Gold C18 (150×2,1 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific, США) с использованием сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000. Масс-спектрометрическую детекцию проводили на масс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive Plus. Данные обрабатывали с помощью программы XCalibur.

Результаты исследования и их обсуждение. ААС стоят на первом месте в группе S1 запрещенного списка веществ Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) и находятся под полным запретом применения как в соревновательный, так и внесоревновательный периоды [4]. В настоящее время основным методом определения и скрининга ААС является газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) с предварительным ферментативным гидролизом и дериватизацией для получения летучих производных. В последние годы все большее значение в допинг-контроле приобретает метод ВЭЖХ-МС(/МС), поскольку для его проведения не требуется стадия дериватизации, возможно определение термолабильных и плохо дериватирующихся ААС.

На первом этапе выполнения работы с целью моделирования метаболизма значимых в допинг-контроле ААС было подготовлено несколько вариантов клеточных систем: монослой гепатоцитов, монослой фибробластов, сокультивирование в виде смеси гепатоцитов и фибробластов [1], [2]. Количество внесенных клеток в пассаже при монокультивировании составляло 5×10^5 для гепатоцитов и 5×10^4 для фибробластов; в пассаже при смешанном культивировании – $3,5 \times 10^5$ для гепатоцитов и $1,5 \times 10^4$ для фибробластов на каждую лунку.

Для тестирования модельных систем использовали ряд ААС: метандиенон, оксандролон и орал-туринобол. Данные стероиды были выбраны поскольку они имеют разные структурные характеристики, в частности количество двойных связей, положение и количество функциональных групп.

Исследование образцов методом ВЭЖХ-МС показал отсутствие метаболизма тестируемых ААС в культуре фибробластов и максимальное количество метаболитов в системах с сокультивированием гепатоцитов и фибробластов. Таким образом, для дальнейшей работы была выбрана модельная система с совместным культивированием обоих типов клеток.

На следующем этапе выполнения работы для моделирования метаболизма ААС проводили сокультивирование гепатоцитов и фибробластов в течение 72 ч. После чего заменяли полную культуральную среду на бессывороточную, вносили тестируемые ААС и инкубировали в течение 72 ч. Отбор образцов культуральной среды проводили каждые 6 ч.

Были изучены параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрической детекции целевых соединений на основе стандартных веществ тестируемых ААС и их метаболитов: метандиенон (6 β -гидроксиметандиенон, 17-эпиметандиенон), оксандролон (17-эпиоксандролон), орал-туринобол (6 β -гидроксиоралтуринобол).

В качестве внутреннего стандарта был выбран экзогенный ААС метилтестостерон. Хотя данное соединение также относится к запрещенным в спорте, однако известно, что оно полностью метаболизируется в организме человека и в исходном виде не экскретируется. Хроматограмма и масс-спектр внутреннего стандарта приведены на рисунке 1.

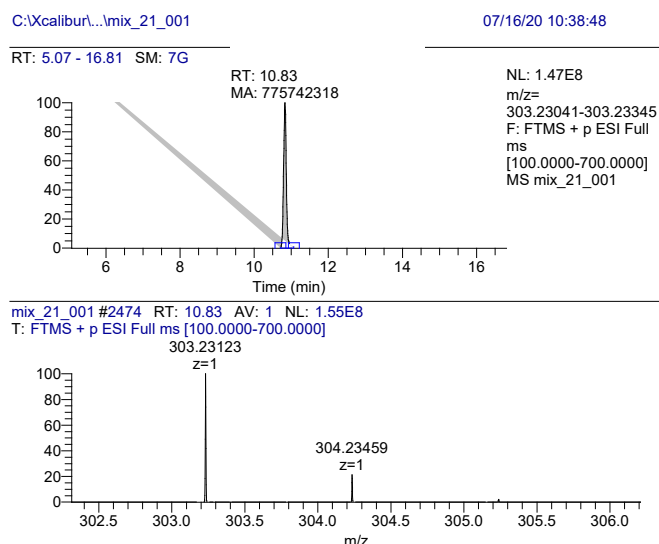


Рисунок 1 – Хроматограмма и масс-спектр внутреннего стандарта – метилтестостерона

В связи с тем, что при масс-спектрометрической детекции имеется возможность селективного выделения соединений с разной молекулярной массой даже в случае совпадающего времени выхода, особое внимание при подборе хроматографических параметров было уделено возможности разделения изомерных форм стероидов. В связи с этим, исходное содержание ацетонитрила в элюирующей системе было выбрано минимально возможным – 5%. Это позволило эффективно селективировать эпимерные формы стероидов (рисунок 2).

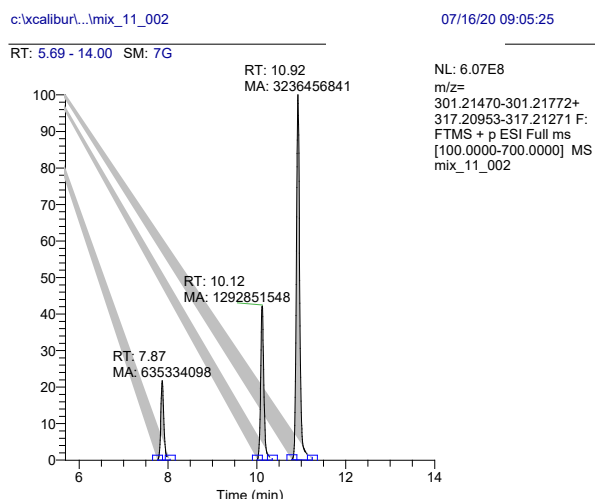


Рисунок 2 – Хроматограмма разделения смеси б β -гидроксиметандиенона, 17-эпиметандиенона и метандиенона при градиенте от 5 % до 100 % ацетонитрила

Анализ характера МС/МС-распада ААС тестировали при средней для данного оборудования коллизионной энергии 20 эВ. Для ряда ААС были получены масс-спектры с удовлетворительными параметрами распада как

по степени деградации материнского иона, так и образованию дочерних фрагментов. С целью оптимизации МС/МС-распада дополнительно был проведен анализ в PRM режиме с коллизионными энергиями 25-40 эВ. Охарактеризованы полученные МС/МС-спектры ААС и их метаболитов. На рисунках 3 и 4 в качестве примера представлены хроматограммы и МС/МС-спектры метаболитов метандиенона – б β -гидроксиметандиенона и 17-эпиметандиенона, демонстрирующие наличие характерической фрагментации данных соединений.

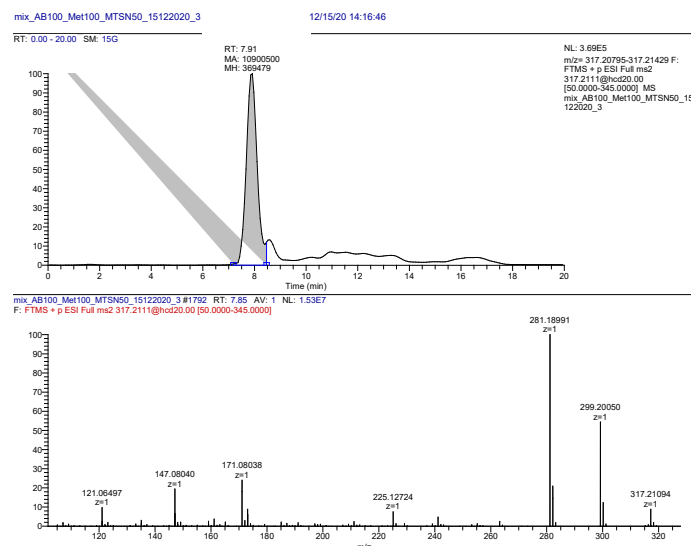


Рисунок 3 – Хроматограмма разделения и МС/МС-спектр метаболита метандиенона – б β -гидроксиметандиенона

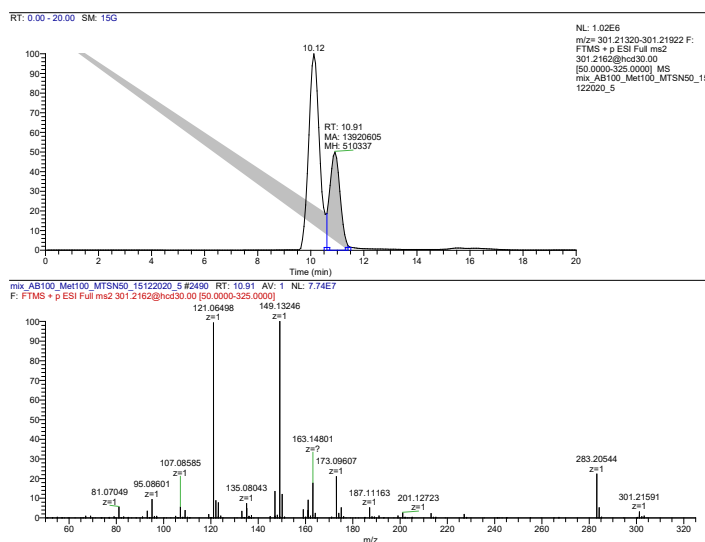


Рисунок 4 – Хроматограмма разделения и МС/МС-спектр метаболита метандиенона – 17-эпиметандиенона

Таким образом, были подобраны универсальные условия для хроматографического разделения и масс-спектрометрической детекции синтетических ААС и их метаболитов.

Выводы. В ходе выполнения работы разработана и апробирована клеточная система для моделирования *in vitro* процессов биотрансформации значимых в допинг-контроле анаболических стероидов.

Список литературы

1. Bachmann A., Moll M., Gottwald E. et al. 3D cultivation techniques for primary human hepatocytes // *Microarrays*. 2015. Vol. 4. P. 64–83.
2. Khetani S.R., Sangeeta B.N. Microscale culture of human liver cells for drug development // *Nature Biotechnol.* 2008. Vol. 26. P. 120–126.
3. Van Zijl F., Mikulits W. Hepatospheres: three dimensional cell cultures resemble physiological conditions of the liver // *World J. Hepatol.* 2010. Vol. 2, № 1. P. 1–7.
4. World Anti-Doping Agency. The 2021 prohibited list. 2021. Available online: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf (accessed on 16-01-2021).

БАКАКИНА Ю.С., БАБАРИКО Д.В., ШИНГЕЛЬ А.М.,
ДАНИЛЕНКО О.В., ПОХОДНЯ Ю.Г., СЯХОВИЧ В.Э.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ГЛИКОПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ КЛЕТОК ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО РАКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ПРОТЕОМИКИ

УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория»,
а.г. Лесной, Республика Беларусь
e-mail: y.bakakina@antidoping.by

BAKAKINA Y.S., BABARYKO D.V., SHYNHEL A.M., DANILENKO O.V.,
PAKHADNIA Y.G., SYAKHOVICH V.E.

STUDY OF THE GLYCOPROTEOMIC PROFILE FEATURES OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS *IN VITRO* USING AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND PROTEOMIC METHODS

National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus
e-mail: y.bakakina@antidoping.by

Аннотация. Для поиска биомаркеров злокачественных новообразований, в частности, гепатоцеллюлярного рака (ГЦР), перспективным представляется исследование особенностей гликопротеомного профиля клеток ГЦР с использованием методов протеомики. Охарактеризован гликопротеомный профиль культуры клеток ГЦР человека HepG2 методом хромато-масс-спектрометрии.

Abstract. The search for biomarkers of malignant neoplasms, in particular, hepatocellular carcinoma (HCC), seems promising to study the features of the glycoproteomic profile of HCC cells using proteomics methods. The glycoproteomic profile of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was characterized using liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

Ключевые слова: гликопротеом, гепатоцеллюлярная карцинома, масс-спектрометрия, аффинная хроматография, лектины, клеточная линия HepG2.

Keywords: glycoproteome, hepatocellular carcinoma, mass spectrometry, affinity chromatography, lectins, HepG2 cell line.

Цель исследования. Изучение особенностей гликопротеомного профиля клеток ГЦР с использованием методов аффинной хроматографии и протеомики.

Материалы и методы исследования. Объект исследования – клетки перевиваемой линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Обогащение N-гликопротеинов из смеси белков, выделенных из клеток линии HepG2, проводили методом аффинной хроматографии с помощью матриц, содержащих лектины (Vector Laboratories, США). Для дегликозилирования белков использовали N-гликозидазу PNGase-F в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Разделение полученных в ходе триптического гидролиза пептидов осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000. Масс-спектрометрическую детекцию пептидов проводили на масс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive Plus. Для анализа масс-спектрометрических данных использовали биоинформационную платформу MaxQuant [4].

Результаты исследования и их обсуждение. Одной из характерных особенностей опухолевых клеток является aberrантное гликозилирование, которое затрагивает как внутриклеточные белки, так и белки на поверхности плазматической мембраны клетки [2]. Установлено, что нарушения в характере углеводной модификации белков обуславливают такие злокачественные свойства клеток как миграция, инвазивность, метастазирование, жизнеспособность, а также их взаимодействие с микроокружением [3]. Aberrантное гликозилирование, которое связано с раковой трансформацией, включает фукозилирование, сиалирование, усиление ветвления N-ацетилглюкозаминов в составе N-гликанов и сверхэкспрессию O-гликанов муцинового типа с измененными олигосахаридными фрагментами [1], [3]. Однако несмотря на активные исследования в области выявления нарушений гликозилирования белков при злокачественных новообразованиях, информация о сайт-

специфических изменениях гликопротеома при различных опухолях, в частности, при ГЦР, ограничена.

В настоящей работе с целью повышения выявляемости гликопротеинов культуры гепатоцитов человека HepG2 было отработано обогащение гликопротеинов с применением метода аффинной хроматографии с использованием матриц с лектинами, обладающими способностью высокоспецифично связывать гликаны. Были подобраны лектины в соответствии с их аффинностью к основным классам олигосахаридных структур. Использование лектинов, обладающих разной аффинностью к гликанам, позволяет охарактеризовать специфический гликопротеомный профиль белков клеток. В таблице 1 приведена характеристика лектинов, использованных в работе.

С помощью подобранных условий был охарактеризован гликопротеомный профиль культуры гепатоцитов человека HepG2 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Осуществлен аннотационный анализ и функциональная классификация гликопротеинов культуры гепатоцитов человека HepG2 с помощью системы классификации «PANTHER».

Таблица 1– Характеристика углеводной специфичности лектинов, используемых в работе

Лектин	Моносахаридная специфичность	Комментарии по специфичности
Лектин из стручков фасоли <i>Canavalia ensiformis</i> (Con A)	глюкоза (α Glc), манноза (α Man)	Разветвленные и терминальные α -D-Man, терминальные фрагменты N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc) в составе гликанов
Лектин чечевицы <i>Lens culinaris</i> (LCA)	глюкоза (α Glc), манноза (α Man)	Комплекс (Man/GlcNAc коровая часть с α -1,6 Fuc)
Агглютинин из семян утесника европейского <i>Ulex Europaeus</i> (UEA-I)	фукоза (α Fuc)	Фукозилированные фрагменты в составе гликанов
Агглютинин из арахиса <i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	терминальная β -галактоза (β Gal)	N-гликаны комплексного типа с терминальными олигогалактозаминовыми фрагментами

Установлено, что 80% идентифицированных гликопротеинов локализовано в мембранной фракции клеток линии HepG2. Среди выявленных мембранных гликопротеинов 74% локализовано в плазматической мембране, 12% – в эндоплазматическом ретикулуме.

Анализ по генным онтологиям показал, что наиболее значимыми молекулярными функциями гликопротеинов культуры гепатоцитов человека HepG2 являются связывание (33,4%) и каталитическая активность (28,8%). Большинство белков с каталитической активностью относятся к классам гидролаз (32,9%) и трансфераз (22,0%), из которых 37,9% составляют гликозилтрансферазы.

Методом аффинной хроматографии с использованием лектинов Con A, LCA, UEA-I и PNA были обогащены лектин-специфические фракции гликопротеинов. Было установлено, что в условиях злокачественной трансформации наблюдаются изменения в характере гликозилирования белков, включающие увеличение содержания гликопротеинов со сложными олигосахаридными цепями и высоким содержанием маннозы, с фукозилированной коровой частью и с олигогалактозаминовыми фрагментами.

Выводы. Данные об особенностях гликопротеомного профиля клеток ГЦР могут быть в дальнейшем использованы для выявления потенциальных диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней для направленной терапии ГЦР.

Список литературы

1. Drake P.M., Cho W., Li B. et al. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation // *Clin. Chem.* 2010. Vol. 56. P. 223–236.
2. Henry N.L., Hayes D.F. Cancer biomarkers // *Molecular Oncology.* 2012. Vol. 6, № 2. P. 140–146.
3. Pinho S.S., Reis C.A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications // *Nature Rev. Cancer.* 2015. Vol. 15, № 9. P. 540–555.
4. Tyanova S., Temu T., Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics // *Nat. Protoc.* 2016. Vol. 11. P. 2301–2319.

БЕЛАШОВА О.В.
**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В
ЭКСТРАКТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
ШЛЕМНИКА ОБЫКНОВЕННОГО И КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО**
Кемеровский государственный медицинский университет, г. Кемерово
e-mail.ru: o-belashova@mail.ru

BELASHOVA O.V.
**INVESTIGATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN
EXTRACTS OBTAINED FROM PLANT RAW MATERIALS OF
COMMON SKULLCAP AND MEADOW CLOVER**
Kemerovo State Medical University, Kemerovo
e-mail.ru: o-belashova@mail.ru

Аннотация. В настоящее время создание функциональных пищевых продуктов, обогащенных биологически активными веществами, выделенных из растений, является приоритетным направлением в области пищевой биотехнологии. Необходимо отметить, что это способствует увеличению ассортимента функциональных продуктов лечебно-профилактической направленности.

Abstract. Currently, the creation of functional food products enriched with biologically active substances isolated from plants is a priority in the field of food biotechnology. It should be noted that this contributes to an increase in the range of functional products of therapeutic and preventive orientation.

Ключевые слова. Биотехнологический процесс, ВЭЖХ, биологически активные вещества, растительное сырье, флавоноиды.

Keywords. Biotechnological process, HPLC, biologically active substances, vegetable raw materials, flavonoids.

Цель исследования. Сегодня одним из основных трендов пищевой промышленности является биотехнологическая разработка инновационных функциональных продуктов на молочной основе.

Творог считается традиционным белковым кисломолочным продуктом, содержит незаменимые аминокислоты и микроэлементы, например кальций, фосфор, магний и др. Это объясняет его высокую пищевую ценность для населения, ведущего здоровый образ жизни. Использование биологически активных веществ растительного происхождения в твороге для создания функциональных продуктов лечебно-профилактической направленности позволит максимально увеличить ассортимент выпускаемых пищевых продуктов функционального назначения [5].

Наше исследование методом ВЭЖХ выявило наличие у шлемника обыкновенного одинаковых биологически активных веществ флавоноидной природы, что и у шлемника байкальского.

В связи с вышеизложенным, является актуальным исследование по совершенствованию технологического процесса производства творожного продукта с биологически активными веществами и его использования в функциональном питании.

Материалы и методы исследования. Сбор материала осуществляли в течение всего вегетационного периода во время экспедиций 2015–2019 гг. Сбор производился маршрутно-полустационарным методом. С учетом месторасположения закладывалась трансекта, в зависимости от размеров особей, состоящая из 10 площадок по 1 м², либо из 20–25 площадок на 0,5 м².

Для исследования фитохимического состава использовались от 10 до 20 растений, находившихся в средневозрастном генеративном состоянии, в фазе конца цветения – начала плодоношения и произрастающих в различных эколого-географических условиях.

Растительные образцы для гербаризации и анализа собирали на территории Кемеровской области в пределах их естественного ареала целенаправленно, а также во время летней учебной практики студентов фармацевтического факультета Кемеровского государственного медицинского университета по ботанике и фармакогнозии. В фитохимических исследованиях использовались методы высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты исследования и их обсуждение. Теоретические и экспериментальные исследования выполнены на кафедре фармации и в центральной научно-исследовательской лаборатории Кемеровского государственного медицинского университета.

Содержание биологически активных веществ в растительном сырье шлемника обыкновенного и клевера лугового определено методами ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominense с диодно-матричным детектором Shimadzu SPD20MA с колонкой HyperClone 5 мкм BDS 130 Å, C-18 250x4,6 мм.

В листьях и корнях шлемника обыкновенного с помощью метода ВЭЖХ обнаружены следующие биологически активные вещества: байкалин, хризин, апигенин, стигмастерин, скутеллареин, лютеолин [2].

Содержание байкалина в корнях и листьях шлемника обыкновенного достигает максимальных значений в каждом исследованном образце данного вида, поэтому можно предположить, что данное вещество обуславливает фармакологические свойства этого вида. Использование байкалина в фармации дает основание его применения в функциональном питании в качестве источника БАВ [1].

Методом ВЭЖХ у клевера лугового в траве определен следующий качественный состав БАВ: формонетин, апигенин, лютеолин.

Впервые обнаружены существенные отличия в качественном составе БАВ в растительном сырье между двумя видами растений: клевером луговым и шлемником обыкновенным. Идентифицированы только два сходных флавонона – лютеолин и апигенин [3].

Преобладание тех или иных флавоноидов может влиять на лечебные свойства и сказывается на рекомендациях по лечебно-профилактическому применению. Например, апигенин обладает способностью сокращать продолжительность жизни раковых клеток, сдерживая распространение онкологического процесса. Лютеолин является мощным противоопухолевым средством, блокирует рост новых кровеносных сосудов в опухолях, преграждает метаболическую активность канцерогенов и останавливает деление раковых клеток.

Предложен новый способ производства творожной массы, обогащенной концентратами растительных биологически активных веществ (патент на изобретение РФ № 2753361 С1 «Способ производства творожной массы, обогащенной концентратами шлемника обыкновенного и клевера лугового» от 13.08.2021 г.) [4].

Выводы. Научно подтверждена перспективность использования биологически активных веществ, выделенных из клевера лугового и шлемника обыкновенного в биотехнологии функционального продукта на основе творога. Методами ВЭЖХ идентифицированы такие флавоноиды, как скутеллареин, апигенин, хризин, стигмастерин, лютеолин, байкалин, хризин, формонетин.

Список литературы

1. Белашова О.В. Биотехнологический процесс создания функционального молочного продукта, обогащенного экстрактом шлемника обыкновенного / О.В. Белашова, А.В. Заушинцева, Н.В. Фотина // Сборник XIII Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса», посвященной 90-летию ДГТУ (РИСХМ). - Ростов-на-Дону, 2020. Т.2. – С. 669-673.
2. Белашова О.В. Содержание байкалина в *Scutellaria galericulata* L. и обоснование его использования при производстве функционального продукта. / О.В. Белашова, А.В. Заушинцева, Н.В. Фотина // Сборник VI международной научно-практической конференции «Биотехнология: взгляд в будущее». – Ставрополь, 2020. – С. 163-165.
3. Белашова О.В., Фотина Н.В. Разработка рецептуры функциональной творожной массы с использованием растительных концентратов шлемника обыкновенного, клевера лугового // В сборнике XVIII Международной научно-практической конференции студентов,

аспирантов, ученых, педагогических работников и специалистов-практиков «Инновационные процессы в науке и технике XXI века». – Тюмень, 2021. С. 214-217.

4. Просеков А.Ю., Бабич О.О., Заушинцена А.В., Белашова О.В., Милентьева И.С., Асякина Л.К., Фотина Н.В. Патент на изобретение 2753361 С1 от 13.08.2021 г. Заявка № 2020119274 от 03.06.2020.

5. Zaushintsena A.V. Extracts of rhodiola rosea L. and Scutellaria galericulata L. in functional dairy products / A. Zaushintsena, E. Bruhachev, O. Belashova, L. Asyakina, M. Kurbanova, A. Vesnina, N. Fotina // Food and Raw Materials. - 2020. Т. 8. № 1. P. 163-170.

БУРЖИНСКАЯ Т.Г., ДЕЙНЕКА В.И., ДЕЙНЕКА Л.А.
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ ДЛЯ
ПОИСКА ПЛОДОВ CAPSICUM ANNUUM, ОБОГАЩЕННЫХ
ПРОИЗВОДНЫМИ ЗЕАКСАНТИНА**

*Белгородский государственный национальный исследовательский
университет, г. Белгород
e-mail: burzhinskaya@bsu.edu.ru*

BURZHINSKAYA T.G., DEINEKA V.I., DEINEKA L.A.
**USING REVERSE-PHASE HPLC TO SEARCH FOR CAPSICUM
ANNUUM FRUITS ENRICHED WITH ZEAXANTHIN DERIVATIVES**

*Belgorod National Research University, Belgorod
e-mail: burzhinskaya@bsu.edu.ru*

Аннотация: В работе метод обращенно-фазовой ВЭЖХ использован для поиска сортов перцев с оранжевой окраской плодов, в которых основными компонентами были производные зеаксантина. Оказалось, что моноэфиры и диэфиры зеаксантина образованы этерификацией ксантофиллов лауриновой, миристиновой и пальмитиновой кислотами. Предложен простой и доступный способ идентификации ксантофиллов.

Abstract: In the paper, the reverse-phase HPLC method was used to select varieties of peppers with orange fruit color, in which the main components were zeaxanthin derivatives. It turned out that zeaxanthin monoesters and diesters are formed by esterification of xanthophylls by lauric, myristic and palmitic acids. A simple and accessible method for identifying xanthophylls is proposed.

Ключевые слова: Capsicum annuum, зеаксантин, эфиры, обращенно-фазовая ВЭЖХ, идентификация

Keywords: Capsicum annuum, zeaxanthin, esters, reverse-phase HPLC, identification

Цель исследования. Настоящая работа посвящена разработке способа поиска плодов сортов *Capsicum annuum*, обогащенных производными зеаксантина. Плоды перца сладкого болгарского относятся к наиболее популярным и широко выращиваемым овощам в РФ в настоящее время благодаря их высокой питательной ценности. Известны сорта с плодами, окрашенными в цвета от зеленого, желтого, оранжевого и до темно-красного. Все эти цвета определяются синтезом хлорофиллов и/или каротиноидов. Типичные красные цвета связаны с биосинтезом в основном капсантина и, в меньшей степени - капсорубина. В цепи биосинтеза [1] после β -каротина образуются окрашивающие кожуру плодов в цвета от желтого до оранжевого β -криптоксантин и зеаксантин. Эти ксантофиллы в дальнейшем трансформируются в 5,6-эпокси-ксантофиллы, изомеризация которых приводит к капсантину и/или капсорубину, см. рис. 1.

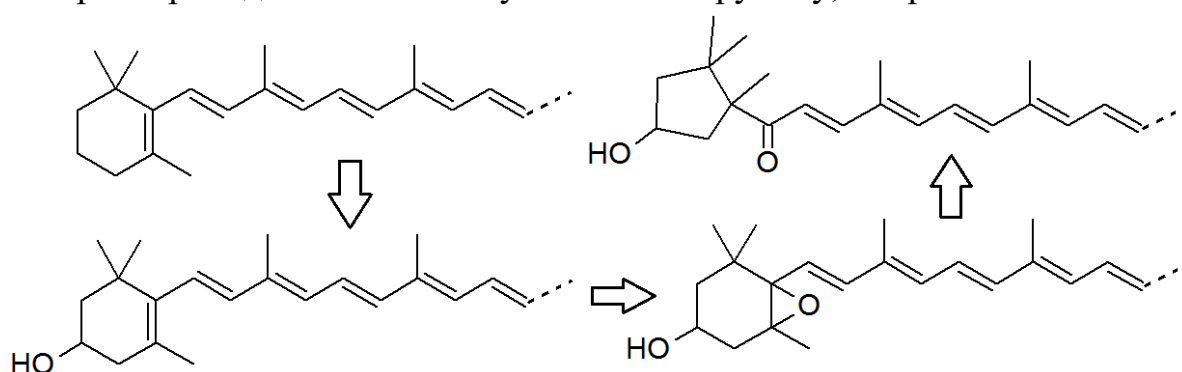


Рис. 1. Некоторые ключевые стадии в биосинтезе капсантина и капсорубина

Иные ксантофиллы также могут синтезироваться в дополнение к указанным выше. Все каротиноиды, начиная с зеаксантина уже не обладают провитаминной А активностью, но остаются эффективными жирорастворимыми антиоксидантами. Кроме того, экстракт перцев красной окраски используется в качестве пищевых красителей (E160c). Однако имеет смысл в способе выделения зеаксантина – как вещества, который вместе со значительно более доступным лютеином необходимы для лечения и профилактики возрастной макулярной дистрофии [2]. И по наши данным прекрасными источниками зеаксантина могут служить плоды некоторых сортов *Capsicum annuum* с характерной темно-оранжевой окраской. Однако оранжевая окраска может быть следствием остановки биосинтеза на стадии образования β -каротина или смесью желтых и красных ксантофиллов. Для дифференциации таких перцев оптимальной является обращенно-фазовая ВЭЖХ.

Материалы и методы исследования. Плоды девяти сортов перца сладкого болгарского с оранжевой окраской (судя по фотографии на упаковке и описанию сорта) были выращены в условиях Белгорода в 2021 г.

Для определения каротиноидов перцы гомогенизировали, замораживали в бытовой морозильной камере и лиофильно высушивали, используя сушилку «LABCONCO FreeZone 2.5» с температурой конденсора 40°C.

Полученные порошки использовали для экстракции каротиноидов ацетоном, который отделяли от твердого остатка, добавляли 20 об. % ацетонитрила. Полученный раствор фильтровали через насадочный фильтр Millipore 40 0.22 µm перед хроматографированием.

Разделение каротиноидов осуществляли на хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором; хроматографическая колонка 250×4.6 мм Kromasil 110-5C18, температура термостата колонки 30°C. Подвижная фаза 20 об.% ацетонитрила и 80 об.% ацетона. Ввод пробы объемом 20 мкм. Запись хроматограммы осуществляли при 450 нм с записью спектров в диапазоне 300 – 650 нм, что позволяло записывать спектры всех разделенных веществ в кювете детектора.

Результаты исследования и их обсуждение. Хроматограмма экстракта образца перца оранжевой окраски, которая соответствовала накоплению производных зеаксантина, представлена на рис. 2.

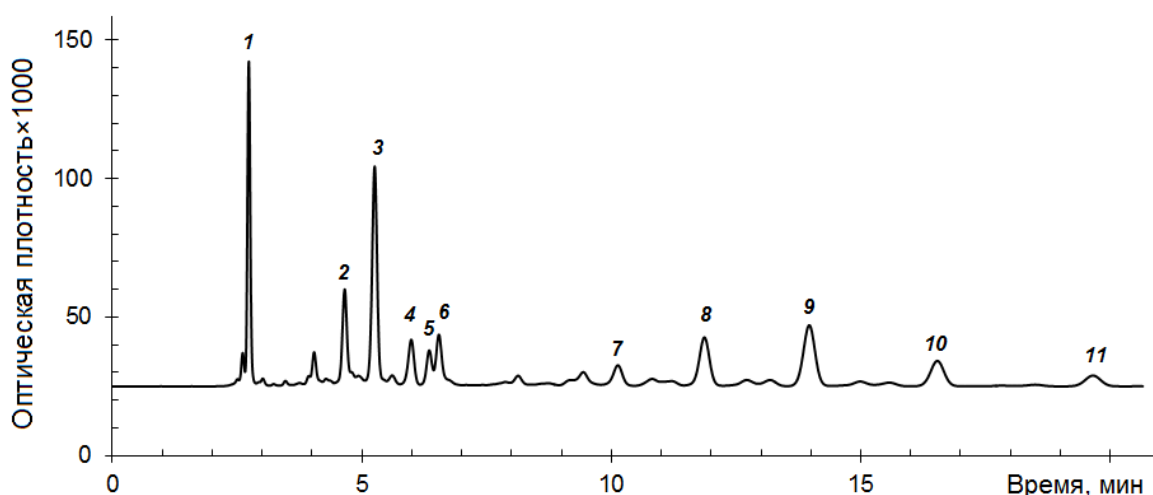


Рис. 2. Разделение каротиноидов перца с накоплением производных зеаксантина

По липофильности и по порядку элюирования (по росту времени удерживания, t_R) возможные производные зеаксантина располагаются в следующем порядке:

$$t_R(\text{зеаксинтин}) < t_R(\text{моноэфиры зеаксантина}) < t_R(\text{диэфиры зеаксантина}).$$

Во многих растениях биосинтез ксантофиллов сопровождается их этерификацией высшими жирными кислотами от лауриновой до пальмитиновой (в перцах [3]), то диэфиры зеаксантина представлены пятью компонентами:

$$t_R(\text{дилаурат зеаксантина — пик №7}) < t_R(\text{лаурат-миристант зеаксантина — пик №8}) < t_R(\text{димиристант зеаксантина — пик №9}) < t_R(\text{миристант-пальмитат зеаксантина — пик №10}) < t_R(\text{дипальмитат зеаксантина — пик №11}).$$

У всех пяти веществ неразличимые электронные спектры поглощения, но расшифровка не вызывает проблем, если воспользоваться экстрактом чашечек физалиса декоративного. Отметим, что использование стандартных образцов чистых каротиноидов для сравнения времен удерживания является крайне неудобным способом из-за их быстрого разрушения при хранении. В то же время каротиноиды в высушенных лепестках цветков хранятся хорошо (более двух лет) без доступа прямого солнечного света. В этом отношении удобно иметь запас высушенного растительного материала, единственное неудобство – необходимость экстрагировать целевые вещества. Прекрасным источником дипальмитата зеаксантина является физалис декоративный [4]. Именно с его использованием было установлено, что пик №11 – дипальмитат зеаксантина. В таком случае остальные компоненты легко определяются, как диэффиры с последовательным удалением двух метиленовых групп. Отметим также, что корректность такого отнесения может быть подтверждена записью масс-спектров, но удобным способом является определение разности в логарифмах факторов удерживания последовательных членов гомологических рядов. Дело в том, что в обращенно-фазовой ВЭЖХ последовательное добавление одной или двух метиленовых групп приводит к одинаковому росту логарифма фактора удерживания.

Поиск моноэфиров также не вызывает особых проблем, поскольку всегда возможно отделение диэфиров от остальных компонентов, например, при использовании ТСХ на силикагеле, с последующим частичным омылением диэфиров зеаксантина 20% раствором NaOH в этаноле. У моноэфиров зеаксантина также появляется ряд гомологов:

$$t_R(\text{лаурат зеаксантина} - \text{пик №2}) < t_R(\text{мирилат зеаксантина} - \text{пик №3}) < t_R(\text{пальмитат зеаксантина} - \text{пик №4}).$$

Наконец, подтверждение отнесения пика №1 как зеаксантина получаем сравнением удерживания в продукте полного омыления диэфиров зеаксантина.

На хроматограмме имеются еще два пика под номерами 4 и 5, их отнесение выполнили по сопоставлению удерживания α - и β -каротинов, экстрагированных из оранжевой моркови, доступной в супермаркетах в течение круглого года. В настоящей работе было установлено, что из 11 сортов перцев с оранжевой окраской хорошими источниками зеаксантина оказались только 4 сорта. В случае остальных сортов хроматограмма была существенно усложнена добавлением пиков веществ с иными электронными спектрами поглощения.

Выводы. Метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с предложенным в работе способом идентификации позволяет обнаруживать сорта перцев оранжевой окраски, необходимых для предотвращения возрастной макулярной дистрофии.

Список литературы

1. del Rocío Gómez-García M., Ochoa-Alejo N. Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum* spp.) // *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 19025-19053
2. Мирзабекова К.А. Возрастная макулярная дегенерация: профилактика и лечение. Обзор. // *Офтальмология.* 2014. Т. 11. № 2. С. 4-8.
3. Matsufuji H.; Nakamura H.; Chino M.; Takeda M. Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*) // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46. P. 3468–3472.
4. Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Дейнека Л.А., Третьяков М.Ю., Фесенко В.В. Исследование плодов *Physalis alkekengi* L. как источника ксантофиллов // *Хим.-фарм. ж.* 2008. Т. 42. № 2. С. 36-37.

¹ КИЛЬДЮШКИН Д.А., ² ЛИТВИН Е.А., ¹ ПЕТУХОВ А.Е.
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРФИРИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЖИДКОСТЯХ ПАЦИЕНТОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ С
ДИАГНОСТИЧЕСКИМИ ЦЕЛЯМИ**

¹ *Первый Московский государственный медицинский университет имени
И.М. Сеченова, г. Москва*

² *ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ, г. Москва
E-mail: kildan@mail.ru*

¹ KILDYUSHKIN D.A., ² LITVIN E.A., ¹ PETUCKOV A.E.
**DETERMINATION OF PORPHYRINS IN BIOLOGICAL FLUIDS OF
PATIENTS BY HPLC FOR DIAGNOSTIC PURPOSES**

¹ *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of
Healthcare of the Russian Federation, Moscow*

² *Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Moscow
E-mail: kildan@mail.ru*

Аннотация: Порфирии – это метаболические заболевания, вызванные наследственными или приобретенными нарушениями биосинтеза гема. В статье обосновывается применение обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием в определении порфиринов. Используемый метод может быть использован при выявлении различных порфиринов в моче и крови пациентов.

Abstract: Porphyrins are metabolic diseases, which caused by hereditary or acquired failures of heme biosynthesis. The article substantiates the use of reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection in

the determination of porphyrins. The method can be used for porphyrin detection in urine and blood of patients.

Ключевые слова: порфирии, диагностика, высокоэффективная жидкостная хроматография, определение порфиринов, УФ-детектирование

Keywords: porphyrias, diagnostics, high performance liquid chromatography, determination of porphyrins, UV detection

Введение. Порфирии – группа гетерогенных заболеваний, вызванных дефектами ферментов биосинтеза гема. Нарушение последовательности синтеза гема приводит к образованию и накоплению промежуточных продуктов: порфиринов и/или их предшественников (рис 1). Эти субстраты накапливаются в крови и тканях, усиленно выделяются с мочой и калом. Порфирии — редко встречающиеся заболевания. Их причисляют к группе орфанных, которые характеризуются сложностями в диагностике. Самым распространённым типом является острая перемежающаяся порфирия - 1/75 000 жителей европейских стран [4].

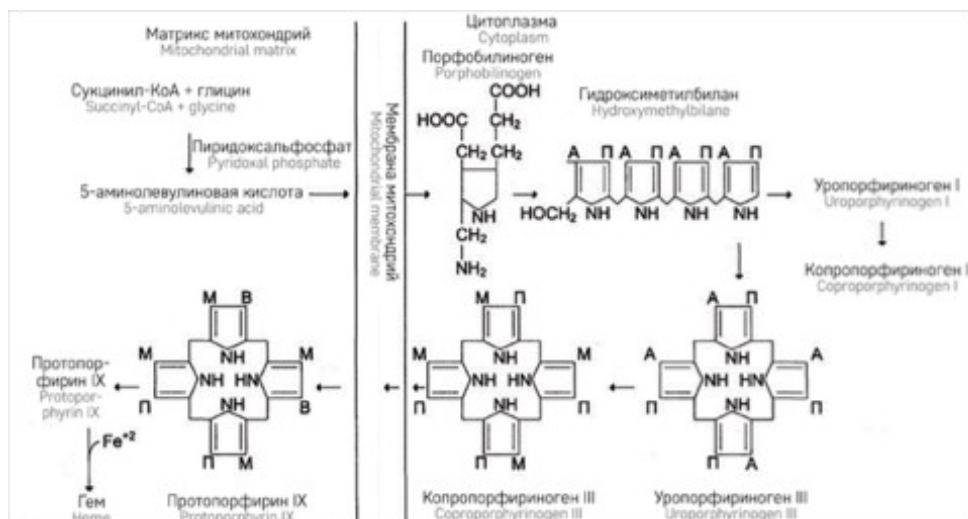


Рисунок 1 – Схема биосинтеза гема.

Распространённость данного заболевания в России насчитывает 7–12/100 000 здоровых людей, как заключили в Национальном гематологическом сообществе [1]. Они связаны с низкой специфичностью симптомов и латентностью протекания патологии. Вследствие этого своевременная диагностика порфирий затруднена. Требуется разработка или адаптация быстрого и специфичного метода диагностики по наличию порфиринов в биоматериале. Для этого необходимо:

1. Разработать методику определения порфиринов в анализируемых биожидкостях методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.
2. Валидировать разработанную методику количественного определения анализируемых веществ в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ.

3. Определить референтные значения маркёров изучаемого заболевания у пациентов в рамках изученной выборки.

4. Сделать вывод о целесообразности применения методики.

Целью работы стало создание метода количественного определения порфиринов в моче и крови человека, которые как раз выступают диагностическими маркерами порфирии. Существуют разные методы диагностики этой группы заболеваний, включающих в себя биохимические, ферментативные и генетические тесты. Тест с реактивом Эрлиха не позволяет определить более редкие формы порфирий. Генетические методы затратны и трудоемки. ВЭЖХ позволяет быстро и бюджетно определить порфирины в биологических жидкостях организма: плазме крови, моче, что делает данный метод весьма полезным в диагностике порфирий. Существующие и описанные в литературе методы [2,3] требуют специфических детекторов (МС, флуориметрия) и расходных компонентов (колонки C-18 bonded silica), что налагает ограничения на оборудование.

Материалы и методы.

Принцип. Обращённо-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием

Образцы. Биологический материал: кровь и моча от пациентов ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ, направленных на исследование, а также кровь и моча добровольцев.

Район исследования. Порфирины в диапазонах концентраций 20 нМ — 2 мкМ.

Пробоподготовка. К аликвотам мочи добавляли 50 мкл внутреннего стандарта и 500 мкл 2М соляной кислоты. К пламе крови добавляли внутренний стандарт, после чего осаждали ацетонитрилом и отбирали супернатант. К остатку добавляли 1М NH₄OH, встряхивали и осаждали повторно. Супернатанты объединяли и закисляли при помощи 7М соляной кислоты. Образцы вводили в хроматограф в объёме 10 мкл при температуре автосэмплера в 12±1 °С.

Материалы.

Система. Waters Acquity UPLC H-CLASS

Детектор. DAD. $\lambda = 400$ нм, $\Delta\lambda = 1,2$ нм

Колонка. Phenomenex Luna® C18(2) 250*4.6, 5 мкм

Подвижные фазы. Фаза А: 1Н ацетат аммония ВЭЖХ-качества в воде, доведённый до pH 5,16 при помощи уксусной кислоты. Фаза В: 100% метанол ВЭЖХ-качества.

Предколонка: фильтр Waters 0,2 м

Температура термостата. Комнатная температура: 25±2°С

Анализируемые параметры. Измеряли интенсивность хроматографических пиков по отношению к интенсивности сигнала внутреннего стандарта. Измеряли время выхода порфиринов с колонки (RT).

Статистическая обработка проводилась при помощи поставляемого ПО к прибору: Empower версии 3.0.

Результаты исследования и их обсуждение. Разработанная методика показывает высокую селективность и чувствительность и позволяет определить девять порфиринов и внутренний стандарт (рис. 2—4). Метод показывает линейность в диапазоне концентраций порфиринов 20 нМ — 2 мкМ, а также характеризуется стабильностью и правильностью. Это делает представленную методику пригодной в диагностике порфирий. Время анализа одной пробы составляет 41 минуту.

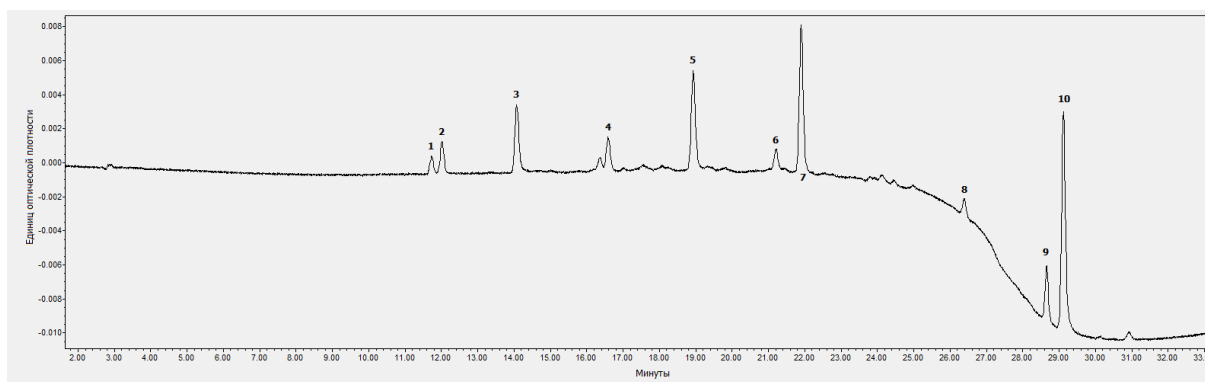


Рисунок 2 – Хроматограмма стандартов порфиринов в донорской моче: 1 – уропорфирин I; 2 – уропорфирин III; 3 – гептакарбоксилпорфирин I; 4 – гексакарбоксилпорфирин I; 5 – пентакарбоксилпорфирин I; 6 – копропорфирин I; 7 – копропорфирин III; 8 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX); 9 – мезопорфирин IX; 10 – протопорфирин IX

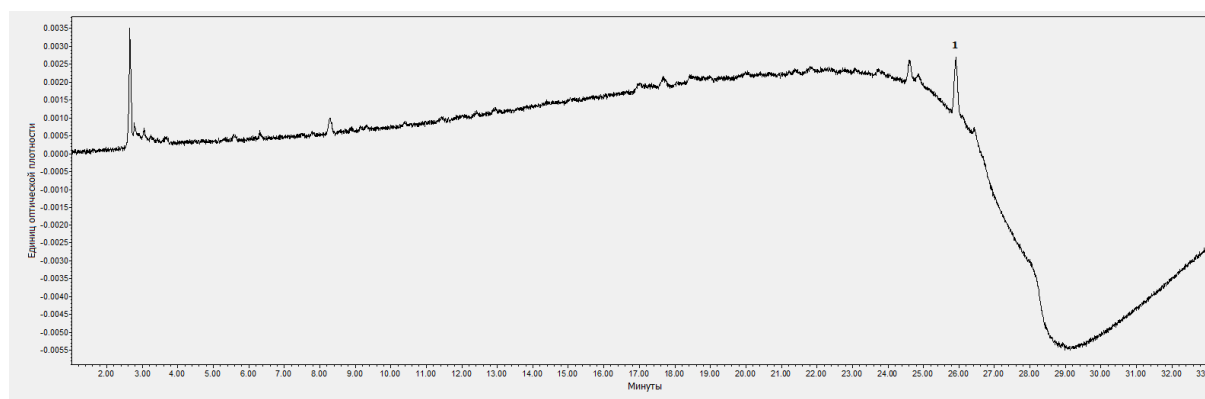


Рисунок 3 – Хроматограмма контрольной донорской мочи с добавлением внутреннего стандарта : 1 — внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX)

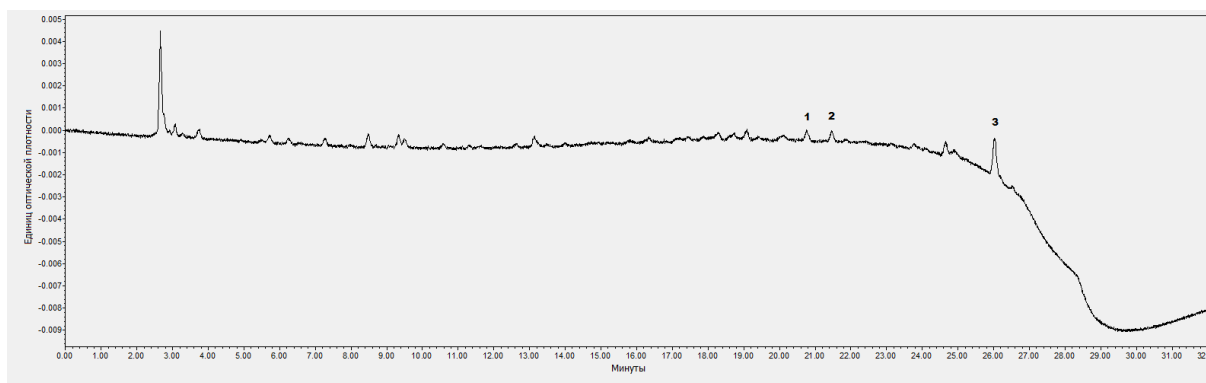


Рисунок 4 – Хроматограмма мочи пациента с подозрением на копропорфирию: 1 – копропорфирин I; 2 – копропорфирин III; 3 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX)

Выводы. На данный момент метод успешно применяется в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва» Минздрава РФ [5]. В будущем нами планируется дальнейшее распространение данного метода в лабораторной, а также клинической практиках. По итогу мы рассчитываем получить один из универсальных и широко используемых способов выявления порфирий, чтобы увеличить процент диагностирования данной группы патологических нарушений на ранних стадиях.

Список литературы

1. Пустовойт Я.С., Кравченко С.К., Шмаков Р.Г., Савченко В.Г.; «Диагностика и лечение острых порфирий. Национальные клинические рекомендации», Москва 2018 г.
2. Macours P. Improvement in HPLC separation of porphyrin isomers and application to biochemical diagnosis of porphyrias. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44 (12): 1433–40.,
3. Hindmarsh J.T., Oliveras L. Biochemical Differentiation of the Porphyrins // *Clin Biochem* 1999; 32 (8): 609–19.]
4. Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrins. *Lancet*. 2010 Mar 13;375(9718):924-37. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61925-5. PMID: 20226990.
5. Пузикова А.И., Литвин Е.А, Кильдюшкин Д.А., Друй А.Е. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в диагностике порфирий // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2021; 20 (3): 140–144. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-3-140-144

ЛЕ В.М.

**КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ЭКСТРАКТОВ
ИЗ БИОМАССЫ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАВОЛГИ
ВЯЗОЛИСТНОЙ ПО ДАННЫМ ВЭЖХ**

Кемеровский государственный университет, г. Кемерово

e-mail: ya808@yandex.ru

LE V.M.

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION OF
EXTRACTS FROM BIOMASS OF A SUSPENSION CULTURE OF
TAVOLGA VIAZOLISA ACCORDING TO HPLC DATA**

Kemerovo State University, Kemerovo

e-mail: ya808@yandex.ru

Аннотация: Методом ВЭЖХ в составе водно-спиртовых извлечений из биомассы суспензионной культуры таволги вязолистной идентифицированы: фенольные кислоты, флавоноиды. В условиях специфических реакций ТСХ в исследуемых образцах установлено содержание тритерпеноидов.

Abstract: The following phenolic acids and flavonoids were identified by the HPLC method as part of water-alcohol extracts from the biomass of the suspension culture of meadowsweet. Under the conditions of specific TLC reactions, the content of triterpenoids was found in the studied samples.

Ключевые слова: хроматография, таволга вязолистная, фенольные кислоты, флавоноиды.

Keywords: chromatography, meadowsweet, phenolic acids, flavonoids.

Лекарственные растения представляют собой важный источник активных биологических соединений, которые могут быть использованы для разработки новых лекарственных препаратов. Одним из лекарственных растений, представляющих несомненный интерес для использования в медицине, является таволга вязолистная (лабазник вязолистный).

Таволга вязолистная (*Filipéndula ulmária* L.) – травянистый многолетник, семейства *Rosaceae*. Таволга характеризуется содержанием фенологликозидов, фенольных кислот, отличаются содержанием эфирного масла, дубильных веществ и др. [1, 2]. В последнее время рассматривается возможность применения суммарных извлечений из Таволги вязолистной для коррекции нарушений мозгового кровообращения. Высокий уровень антропогенной нагрузки на окружающую среду, уменьшение промышленно значимых площадей заросли создают предпосылку получения биологически активных соединений из каллусных культур.

Целью данной работы было исследовать качественный и количественный состав биологически активных веществ в экстрактах

биомассы суспензионной культуры таволги вязолистной методами хроматографического анализа.

Материалы и методы. Воздушно высушенные культуры каллусов (около 5г) были измельчены и дважды экстрагированы EtOH (дробно по 25 мл) в течение 24ч при комнатной температуре. Экстракты объединены, и подвергнуты фильтрации через миллипоровый фильтр (0,45мкм). Экстракты подвергали анализу.

УФ-спектры регистрировали с использованием двухлучевого спектрофотометра UV-1800, фотометрировали как чистые компоненты, так и с добавлением реактивов, позволяющих выявить расположение гидроксильных групп и место гликозидирования.

Хроматографический анализ. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Sorbfil PTS-AF-A. Экстракт наносили на линию старта, высушивали и помещали в хроматографическую камеру, заполненную смесью: н-бутанол-уксусная кислота-вода (60-15-25). Проявление раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты 25% с последующим прогреванием при 95⁰С -10 мин. Денситометрический анализ пластины проводили с использованием денситометра с системой фотофиксации Sony (Handycam HDR-CX405), ООО “ИМИДЪ”, Россия).

ВЭЖ хроматография (ВЭЖХ). Анализ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором Shimadzu SPD-20-МА и рефрактометрическим детектором RID-10А. Использовалась хроматографическая колонка Kromasil 5 мкм С18, 250×4,6 мм; предколонка Security Guard Gartridge (С18) Phenomenex (США), объём инъекции 20 мкл. Температура колонки 30⁰С. Режим элюирования изократический, состав подвижной фазы: АсСN: ИПС: Н₂О- Н₃РO₄ (20:5:75 рН 3.5).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что изучаемые экстракты содержат сумму фенольных соединений. Ведущими простыми фенолами изученных образцов являются метиловый эфир салициловой кислоты (метилсалицилат) и его биозид – гаультерин. Значительное количество простых фенольных соединений прослеживается на УФ-спектрах образцов. Все образцы в УФ области обладают максимумами при 271нм. По результатам реакций фитохимического скрининга установлено, что образцы содержат флавоноидные соединения.

Суммарное содержание флавоноидов в пересчёте на кверцетин в экстракте составило 69,0мг/г.

В условия специфических реакций ТСХ в исследуемых образцах установлено содержание дающих положительную реакцию с 25% спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты, окрашенные пятна обладали розово-сиреневой окраской. Есть предположения, что данные соединения тритерпеноидной природы. Проявленным компонентам соответствуют значения $R_f = 0,03; 0,86; 0,95$. Визуализация представлена на денситограмме.

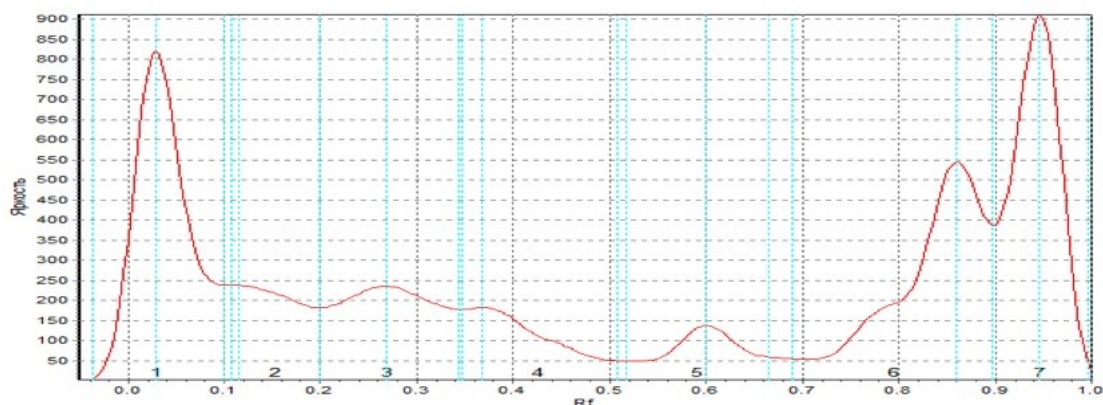


Рисунок 1. Денситограмма экстракта каллусных культур таволги вязолистной

В условиях ВЭЖХ с метчиками-стандартами и по спектральным спецификациям в УФ- области удалось установить соединения фенольной и флавоноидной природы.

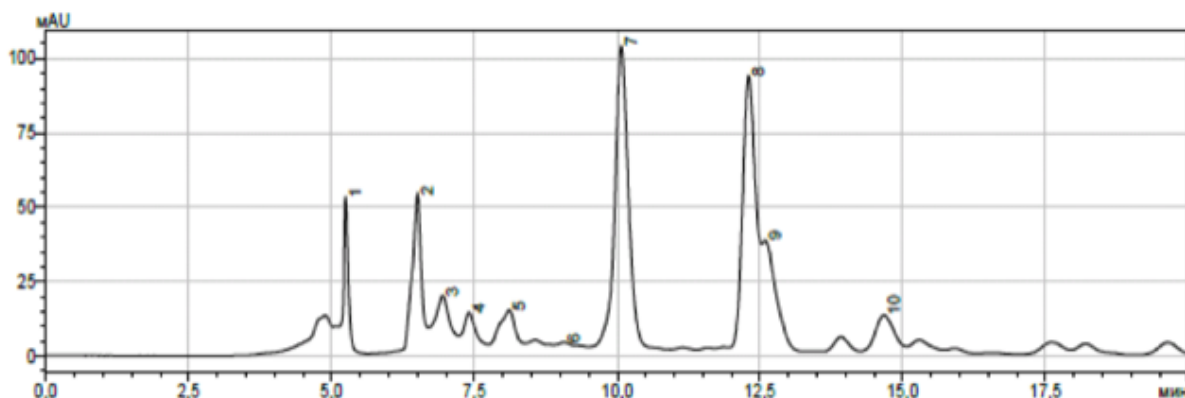


Рисунок 2. ВЭЖХ хроматограмма образца экстракта: пик 1 – галловая кислота, пик 2 – 4-гидроксибензойная кислота, пик 3 – 2-метоксифенол, пик 4 – пирокатехин, пик 5 – 4-венил-2-метоксифенол, пик 6 – бензальдегид, пик 7 – спиреозид, пик 8 – авикулярин, пик 9 – авикулярин, пик 10 – *m*-гидроксибензойная кислота (*непронумерованные пики на хроматограмме принадлежат неидентифицированным веществам).

Компоненты и их время удерживания представлены в таблице 2.

Таблица 2. Компонентный состав водно–спиртового экстракта таволги по данным ВЭЖХ

№ пика	Время Удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мкг/мл
1	5,25	галловая кислота	6,70 ± 0,21
2	6,50	4-гидроксibenзойная кислота	11,87 ± 0,76
3	6,90	2-метоксифенол	4,52 ± 0,50
4	7,41	пирокатехин	5,33 ± 0,50
5	8,11	4-венил-2-метоксифенол	4,51 ± 0,50
6	9,62	бензальдегид	2,17 ± 0,20
7	10,07	спиреозид	15,39 ± 0,72
8	12,30	авикулярин	21,33 ± 0,86
9	12,59	гиперозид	9,80 ± 0,50
10	14,67	салициловая кислота	3,47 ± 0,14

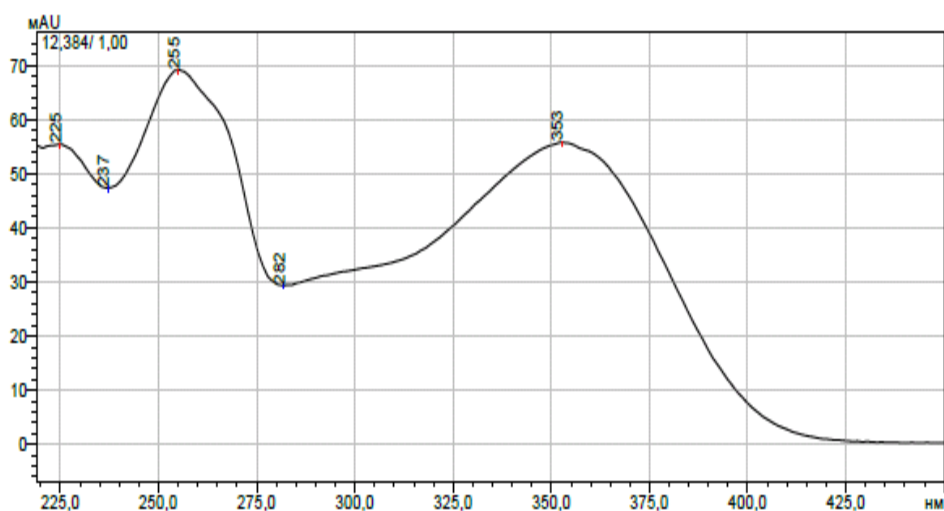


Рисунок 3. УФ - спектр авикулярина

Установлено содержание флавоноида авикулярина.

Выводы. Анализ качественного и количественного состава экстрактов, полученных из биомассы каллусных, суспензионных культур позволил определить компонентный состав и их количественное содержание. По данным хроматографического анализа установлено, что исследуемые образцы содержат кверцетин и его гликозидированные формы. В условиях специфических реакций ТСХ в исследуемых образцах установлено содержание тритерпеноидов.

Список литературы

1. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений /под ред. Проф. Г.П. Яковлева. СПб. Спец. Лит. 2015. 759с.
2. Растительные ресурсы России. Семейства Fabaceae - Ариáceae Т.3. /ответ ред. А.Л. Буданцев СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. - 601с.

¹МИХАЙЛОВА П.А., ^{1,2}ГЕНЕРАЛОВА Ю.Э.
**ИЗУЧЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ
ДИФЛУНИЗАЛА**

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, г. Санкт-Петербург

²Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург
e-mail: polina.mihajlova@spcpu.ru

¹MIKHAYLOVA P.A., ²GENERALOVA Yu.E.
RESEARCH OF CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOR OF DIFLUNISAL

¹Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg

²ITMO University, Saint-Petersburg
e-mail: polina.mihajlova@spcpu.ru

Аннотация: в статье рассматриваются возможности и условия проведения анализа лекарственного препарата дифлунизала методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также поведение данного физико-химического метода анализа при разных соотношениях подвижных фаз, при варьировании элюентов и при различных режимах элюирования.

Abstract: the article reviews the possibilities and conditions for analyzing the drug named diflunisal by high-performance liquid chromatography, as well as behavior of this physicochemical method of analysis at the different mobile phases ratios, at the various eluents and at the different elution modes.

Ключевые слова: дифлунизал, ВЭЖХ, лекарственные препараты, подбор условий, хроматографическое поведение.

Keywords: diflunisal, HPLC, drugs, condition selection, chromatographic behavior.

Цель исследования. Подбор оптимальных условий проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для количественного определения дифлунизала.

Материалы и методы исследования. Объектом данного исследования является субстанция-порошок дифлунизала, (5-(2,4-

дифторфенил)-2-гидроксibenзойная кислота) по своим физико-химическим свойствам является органической кислотой, $pK_a=2,69$ [2].

Оборудование и реактивы: аналитические весы САРТОГОСМ СЕ224-С (ООО «Сартогосм», Россия), спектрофотометр Shimadzu UV-1240 mini (Shimadzu, Япония), хроматограф жидкостной Миллихром-А02, оснащённый ультрафиолетовым детектором (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия), хроматографическая колонка Prontosil 120-5, С18, 75×2 мм (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия), 0,1 % раствор фосфорной кислоты, этанол 95%, ацетонитрил, 0,03% раствор трифторуксусной кислоты, вода дистиллированная.

При подборе хроматографических условий за основу была взята методика, используемая при исследовании смеси диклофенака с дифлунизалом, где в качестве подвижной фазы были использованы 0,05 М фосфорной кислоты, ацетонитрил и метанол в соотношении 40:48:12 [3]. Оценку пригодности подобранных условий проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ XIV издания [1].

Результаты исследования и их обсуждение. Первым этапом исследования был выбор аналитической длины волны, для чего был снят спектр поглощения дифлунизала. Для этого нами был приготовлен спиртовой раствор препарата концентрацией $C=1,0$ мг/мл, который затем разбавлен до концентрации 10,0 мкг/мл водой и раствором 0,1% фосфорной кислоты. Результаты изучения спектральных характеристик приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Спектральные характеристики дифлунизала

λ_{max} , нм	A	α , мл/(мг×см)	ϵ , л/(моль×см)
Водный раствор дифлунизала (C=10,00 мкг/мл)			
205,0	1,363	136	34102
252,0	0,571	57,1	14286
306,0	0,121	12,1	3027
Подкисленный раствор дифлунизала (C=10,00 мкг/мл)			
205,0	0,700	70,0	17514
227,5	0,592	59,2	14812
314,0	0,092	9,2	2302

Для ВЭЖХ-анализа кислая среда более предпочтительна, поэтому спектр подкисленного раствора имел больший интерес. Для него максимальные значения светопоглощения дифлунизала наблюдается при длинах волн 205, 230 и 314 нм. Длине волны 205 нм не является специфичной и не рекомендуется для использования в качестве аналитической. Для ВЭЖХ была выбрана длина волны 230 нм.

Вторым этапом исследования стал выбор природы подвижной фазы. Определение проводили в условиях: хроматографическая колонка 75×2 мм, заполненная сорбентом Prontosil C18, 5 мкм; термостат колонки 40°C; скорость потока – 0.1 мл/мин; длины волн детектора – 230, 270, 310 нм. В качестве одного из элюентов был использован ацетонитрил. Вторым элюентом необходимо было выбрать такой реагент, который бы подавлял диссоциацию дифлунизала. Были рассмотрены варианты фосфатно-буферных растворов (с разными значениями pH) и растворы кислот (фосфорная, уксусная, трифторуксусная). Проведённые эксперименты показали, что значение pH, при котором достигаются оптимальные хроматографические параметры пика, составляет 3,0. Наилучшие результаты были получены при использовании фосфатного буфера с указанным значением pH и 0,03% раствора трифторуксусной кислоты. При работе мы столкнулись с тем, что фосфатный буферный раствор со временем высаливается в узлах прибора, что приводит к порче оборудования, поэтому для дальнейшего «рутинного» анализа мы выбрали 0,03% раствор трифторуксусной кислоты.

Следующим этапом работы стал выбор соотношения компонентов элюента, подбор проводили экспериментально, меняя соотношение подвижных фаз. Результаты анализа приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Хроматографические параметры пика при изменении состава подвижной фазы

Соотношение 0,03 % раствора трифторуксусной и ацетонитрила	t _r , мин	N	As
50:50	6.78	5968	1.22
40:60	4.02	4653	1.16

При содержании в подвижной фазе 60% ацетонитрила наблюдается наилучшая асимметрия пика, оптимальное время удерживания и эффективность. Типичная хроматограмма раствора дифлунизала в выбранных условиях представлена на рисунке 1 (соотношение подвижных фаз трифторуксусной кислоты и ацетонитрила 40:60).

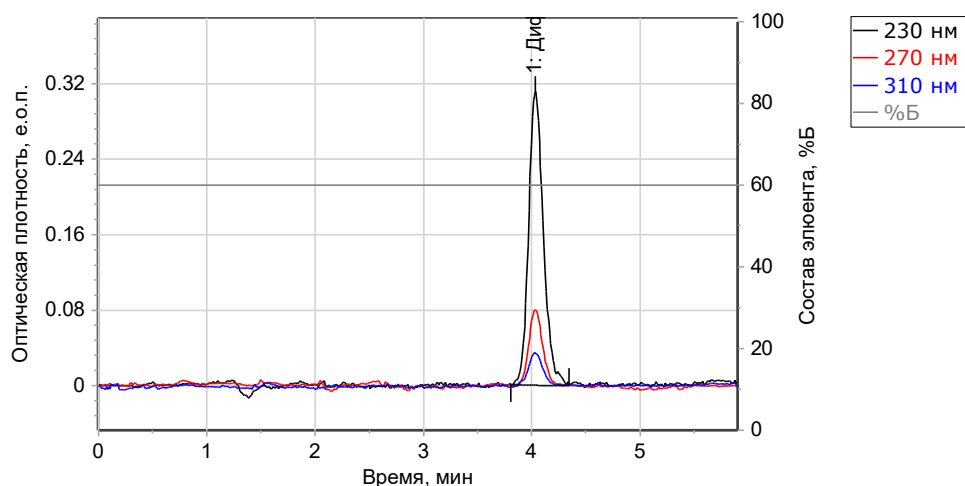


Рисунок 1 – Хроматограмма раствора дифлунизала, полученная в выбранных условиях

Выводы. В результате проведенного эксперимента подобраны оптимальные условия для проведения количественного определения дифлунизала методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, оптимальные условия: подвижная фаза – смесь 0,03% трифторуксусной кислоты и ацетонитрила (40:60), термостат колонки 40°C, скорость потока – 0.1 мл/мин, длина волны детектора – 230, 270 нм.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т.1. – Москва, 2018. – 1814 с.
2. PubChem [Internet] / National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2004. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diflunisal> (cited 2021 Nov. 7)
3. Rasha A. Shaalan, Tarek S. Belal (Eds.). Validated Stability-Indicating HPLC-DAD Method for the Simultaneous Determination of Diclofenac Sodium and Diflunisal in Their Combined Dosage Form // Scientia Pharmaceutica. 2013. Vol. 81(3). P. 713-731. doi:10.3797/scipharm.1301-24

НЕСТЕРОВА Н.В.
**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ
ЛИСТЬЕВ МУШМУЛЫ (FOLIA MESPILLI)**

*ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
e-mail: nestero-nadezhda@yandex.ru*

NESTEROVA N.V.
**CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF PHENOLIC SUBSTANCES OF
MEDLAR LEAVES (FOLIA MESPILLI)**

*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation, Moscow
e-mail: nestero-nadezhda@yandex.ru*

Аннотация: в ходе исследования методом ВЭЖХ было выявлено значительное количество веществ полифенольной природы, содержащихся в водно-спиртовых извлечениях, полученных из листьев мушмулы (*Mespilus germanica* L.), заготовленных от дикорастущих растений, а также от молодых растений, выращенных в горшечной культуре. Анализ показал идентичность набора фенольных соединений, представленных классами флавоноидов (лютеолин, кверцетин, дигидрокверцетин), полифенольных соединений (эпигаллокатехингаллат, эпикатехин), фенолкарбоновых кислот (галловая и хлорогеновая), а также фенологликозидов (арбутин).

Abstract: The HPLC study revealed a significant amount of polyphenolic substances contained in water-alcohol extracts obtained from medlar leaves (*Mespilus germanica* L.) harvested from wild plants, as well as from young plants grown in pot culture. The analysis showed the identity of a set of phenolic compounds represented by classes of flavonoids (luteolin, quercetin, dihydroquercetin), polyphenolic compounds (epigallocatechingallate, epicatechin), phenolic carboxylic acids (gallic and chlorogenic), as well as phenol glycosides (arbutin).

Ключевые слова: листья мушмулы, дикорастущее и культивируемое сырье, фенольные соединения, ВЭЖХ

Keywords: medlar leaves, wild and cultivated raw materials, phenolic compounds, HPLC

Цель исследования. Проведение предварительного хроматографического анализа листьев мушмулы, произрастающей на Северном Кавказе и культивируемой в качестве горшечной культуры.

Материалы и методы исследования. Объектом нашего исследования явились листья мушмулы, заготовленные от дикорастущих растений, произрастающие на Северном Кавказе, а также от молодых образцов, выращенных в течение года в горшечной культуре.

Заготовленные листья высушивались методом теневой сушки, измельчались до размера частиц, проходящих сквозь сито диаметром отверстий 2 мм. Пробоподготовка включала экстракцию полифенольных веществ спиртом этиловым 70% при нагревании с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 60 минут с момента фиксации точки кипения экстракционной спиртоводной смеси. По окончании времени экстракции извлечение охлаждали, фильтровали в мерную колбу и доводили до объема 50 мл спиртом этиловым. Также готовилась смесь стандартных образцов фенольных соединений галловой кислоты, хлорогеновой кислоты, эпикатехина, эпигаллокатехингаллата, дигидрокверцетина, лютеолина, кверцетина и арбутина. Анализ веществ фенольной природы проводили методом ВЭЖХ, по методике, используемой нами ранее для анализа полифенольных веществ растений семейства Розоцветные [1, 2], на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «GILSON», модель 305 (Франция), инжектор ручной, модель RHEODYNE 7125 USA с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы Мультихром для Windows. В качестве неподвижной фазы использовали металлическую колонку размером 4,6 x 250 мм KROMASIL C18, размер частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил – вода – кислота фосфорная концентрированная в соотношении 20: 80: 0,05. Анализ осуществляли при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 1,0 мл/мин. Продолжительность анализа от 40 до 60 мин. Детектирование осуществляли с помощью УФ-детектора «GILSON» UV/ VIS модель 151 при длине волны 370 нм.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе проведенного ВЭЖХ анализа извлечений из листьев мушмулы, идентификацию разделяемых компонентов осуществляли, сопоставляя времена удерживания пиков, полученных на хроматограмме проб, с временами удерживания используемых стандартных образцов. В водно-спиртовых извлечениях листьев мушмулы, заготовленных от дикорастущих растений и горшечной культуры, обнаружены 14 соединений, среди которых идентифицированы 8 соединений фенольного характера, относящихся к классам флавоноидов (лютеолин, кверцетин, дигидрокверцетин), полифенольным соединениям (эпигаллокатехингаллат, эпикатехин), фенолкарбоновые кислоты (галловая и хлорогеновая), а также арбутин. Идентичность фенольного профиля подтверждает перспективность использования растений, выращенных в горшечной культуре, в качестве источника веществ полифенольной природы, обеспечивающих сырью широкий комплекс фармакологической активности.

Выводы. Проведен анализ полифенольных веществ, содержащихся в водно-спиртовых извлечениях, полученных из листьев мушмулы, заготовленных от дикорастущих растений, а также от молодых растений,

выращенных в горшечной культуре. Анализ показал идентичность набора фенольных соединений, что говорит о перспективности использования культивируемых растений в производстве экстракционных препаратов на основе сырья мушмулы.

Список литературы

1. Н.В. Нестерова, И.А. Самылина, Бобкова Н.В., Кузьменко А.Н., И.И. Краснюк (мл.). Количественное определение гидроксикоричных кислот и анализ динамики их накопления в листьях яблони лесной [Текст] // Вестник московского университета. серия 2: химия ИФ. – 2019. – Т. 60. – № 1. – С.60-64.

2. Н.В. Нестерова, И.А. Самылина, А.Н. Кузьменко, И.А. Кузьменко, И.И. Краснюк (мл.), А.А. Евграфов. Количественное определение арбутина в листьях яблони лесной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Текст] // Вестник московского университета. серия 2: химия ИФ. – 2019. – Т. 60. – № 1. – С.55-59.

3. Н.Н. Вдовенко-Мартынова Исследование фенольного комплекса листьев мушмулы германской *Mespilus germanica* L. Фармация и фармакология. № 4 (5), 2014

4. В. А. Сысоев, Д. А. Халитова Хроматографическое изучение фенольного состава сухого экстракта из листьев мушмулы. БИОХИМИЯ И BIOTEХНОЛОГИЯ

ОЛЕЙНИЦ Е.Ю., ДЕЙНЕКА В.И.
**ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ: ЗАМЕНА АЦЕТОНИТРИЛА НА
ЭКОЛОГИЧЕСКИ БОЛЕЕ ПРИЕМЛЕМЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ ПРИ
СОВМЕСТНОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ КОФЕИНА И ХЛОРОГЕНОВЫХ
КИСЛОТ**

*Белгородский государственный национальный исследовательский
университет, г. Белгород
e-mail: oleinits_e@bsu.edu.ru*

OLEINITS E.Yu., DEINEKA V.I.
**REVERSE-PHASE HPLC: REPLACEMENT OF ACETONITRILE
WITH ENVIRONMENTALLY MORE ACCEPTABLE SOLVENTS IN
THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CAFFEINE AND
CHLOROGENIC ACIDS**

*Belgorod National Research University
e-mail: oleinits_e@bsu.edu.ru*

Аннотация: В работе предложен подход по замене ацетонитрила на экологически более благоприятные растворители, изопропиловый спирт и этилацетат, для определения при совместном присутствии кофеина и монокофеоилхинных кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ, а также выполнен количественный анализ напитков, приготовленных из сушеных листьев чая мате и двух видов кофе (молотого и растворимого).

Abstract: The paper proposes an approach to replace acetonitrile with environmentally more favorable solvents isopropyl alcohol and ethyl acetate for determination in the simultaneous presence of caffeine and mono-caffeoylquinic acids in reverse-phase HPLC, and quantitative analysis of beverages made from dried mate leaves and two types of coffee (ground and soluble).

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ, кофеин, хлорогеновые кислоты, селективность разделения, эффективность разделения.

Keywords: reverse-phase HPLC, caffeine, chlorogenic acids, separation selectivity, separation efficiency.

Цель исследования. Исследование хроматографического поведения в обращенно-фазовой ВЭЖХ кофеина и хлорогеновых кислот при их совместном присутствии в элюентах на основе ацетонитрила и при замене ацетонитрила на более экологически приемлемые растворители.

Материалы и методы исследования. В работе в качестве объектов исследования были использованы чай мате и кофе, в качестве стандартных веществ – 5-кофеоилхинную кислоту (chlorogenic acid hemihydrate, ALDRICH) и кофеин (China). Экстракцию осуществляли настаиванием навесок растительного материала (1 г) в горячей воде (100 мл). Полученные экстракты охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через

бумажный фильтр. Перед хроматографированием полученные экстракты очищали методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах ДИАПАК С18 (БиоХимМак СТ, РФ). Смесь хлорогеновых кислот и кофеина рекстрагировали поэтапно. На первом этапе через патрон пропускали 3 мл рекстрагента (5 об.% этилацетата и 3 об.% муравьиной кислоты в воде), получая таким образом кофеин и монокофеоилхинные кислоты. Полученный элюат разбавляли дистиллированной водой в 4 раза. На втором этапе с патрона проводили рекстракцию оставшихся более липофильных веществ пропусканием через патрон 3 мл смеси 30 об% ацетонитрила и 30 ою.% муравьиной кислоты в воде. Полученный элюат разбавляли дистиллированной водой в 3 раза.

Определение кофеина и хлорогеновых кислот проводили в изократическом режиме с использованием хроматографической системы Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором на хроматографической колонке 150×4.6 mm Symmetry C18, 3.5 μm. Температура термостата колонки 30°C, скорость подачи подвижной фазы – 0.8 мл/мин. Для приготовления подвижной фазы были использованы растворители: ацетонитрил (gradient grade for liquid chromatography, Lichrosolv, Germany), 2-пропанол (Реахим, РФ), этилацетат (Компонент-Реактив, РФ).

Результаты исследования и их обсуждение: Хлорогеновые (монокофеоилхинные) кислоты – вторичные метаболиты, синтезируемые во многих растительных объектах. Благодаря наличию *ortho* OH-групп данные соединения обладают высокой антиоксидантной активностью. Термин «хлорогеновые кислоты» возник как обобщенное название продуктов этерификации хинной кислоты замещенными коричными кислотами, рис. 1.

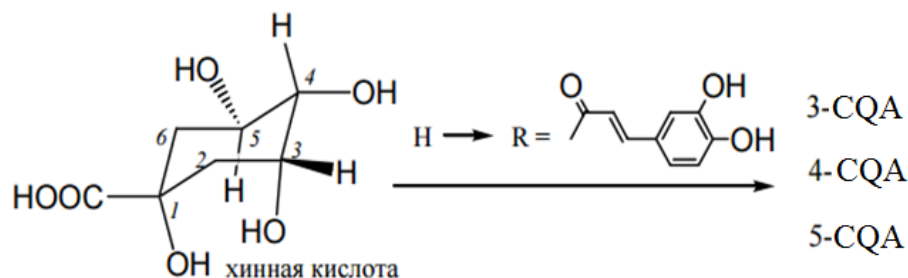


Рис. 1. Возможные пути протекания реакции этерификации

Благодаря наличию в структуре хинной кислоты четырех гидроксильных групп возможно существование четырех изомеров хлорогеновой кислоты: 1-кофеоилхинная кислота, 1CQA, 3-кофеоилхинная кислота, 3CQA, 4-кофеоилхинная кислота, 4CQA, 5-кофеоилхинная кислота, 5CQA. Последние три изомера – наиболее часто встречающиеся в природе.

Распространенным методом определения как хлорогеновых кислот, так и кофеина является метод обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ), а

самым популярным растворителем для приготовления подвижных фаз – ацетонитрил, который весьма дорогостоящ и негативно влияет на человека и окружающую среду. В связи с чем в настоящее время актуальным является поиск экологически более благоприятных растворителей в хроматографии.

Разделение изомеров монокофеоилхинных кислот для ОФ ВЭЖХ не характерно, но возможно при гидрофобном выталкивании высокополярного фрагмента (радикала хинной кислоты) на поверхность стационарной фазы. В работе было установлено, что для всех исследованных органических модификаторов удерживание растет в ряду $3CQA < 5CQA < 4CQA$, причем во второй паре различие существенно меньше, чем в первой паре. При этом удерживание кофеина в сравнении с хлорогеновыми кислотами зависит от органического модификатора подвижной фазы. При разделении этих веществ необходимо использовать подкисление для стабилизации зарядового состояния аналитов.

В работе предлагается селективность разделения смеси кофеина и хлорогеновых кислот оценивать по картам разделения, построенных для широкого диапазона составов подвижных фаз выбранной элюентной системы. При наложении таких карт для различных элюентных систем становятся очевидными различия в селективности разделения веществ. Построенные по уравнению относительного удерживания (1):

$$\log k_i = a \cdot \log k(R) + b \quad (1),$$

карты позволяют прогнозировать хроматографическое поведение анализируемых соединений (возможный порядок удерживания, его инверсия или соэлюирование аналитов). В уравнении (1) R – вещество сравнения, a – параметр, соответствующий отношению числа высвобождаемых молекул органического модификатора относительно вещества сравнения. При неизменности зарядового состояния вещества экспериментальные данные соответствуют линейной аппроксимации на картах разделения, при этом эти уравнения должны быть одинаковыми для растворителей с одинаковой селективностью, но с различной элюирующей силой.

Замена ацетонитрила на изопропиловый спирт приводит к меньшему относительному удерживанию $3CQA$ и $4CQA$ (относительно $5CQA$) за счет большего различия параметров a линий трендов для обоих изомеров. И если при использовании ацетонитрила в ряде составов подвижных фаз возникают проблемы разделения кофеина и $4CQA$ и $5CQA$, то в данном случае пики кофеина хорошо отделяются от пиков сильнее удерживаемой $5CQA$ во всем диапазоне составов подвижной фазы. Отметим, что при использовании изопропилового спирта в качестве подкислителя подвижной фазы предпочтительнее выбирать неорганические кислоты (в нашем случае ортофосфорная кислота) во избежание реакции этерификации, которая способствует нестабильной во времени элюирующей силе подвижной фазы.

При замене ацетонитрила на этилацетат наблюдается более компактное элюирование всех трех изомеров кофеилхинных кислот без инверсии времен удерживания для 4CQA и 5CQA, при этом относительное удерживание 3CQA возрастает. Время удерживания кофеин оказывается даже меньше по сравнению с 3CQA. Это важно, поскольку возможен выбор элюента для отделения кофеина не только от хлорогеновых кислот, но и от других сопутствующих экстрактивных веществ. Достоинством замены ацетонитрила на этилацетат является его более экономичный расход даже по сравнению с изопропиловым спиртом (от 1.5 до 4 об. %). Это позволяет расценивать этилацетат, как экологически более благоприятный растворитель для такого направления, как «зеленая» хроматография.

Помимо применения этилацетата в качестве органического модификатора подвижной фазы при хроматографировании его использование при пробоподготовке также играет важную роль. В случае очистки экстрактов и кофе и мате методом твердофазной экстракции в качестве элюента для десорбции применяли раствор, содержащий 5 об. % этилацетата и 3 об. % муравьиной кислоты в воде. Это позволило десорбировать только кофеин и монокофеилхинные кислоты, оставляя на патроне более липофильные соединения, включая окрашенные в коричневый цвет продукты полимеризации. Такой результат позволяет отказаться от градиентного режима элюирования для очистки колонки от сопутствующих экстрактивных веществ, что существенно уменьшает время единичного определения и уменьшает расход подвижной фазы.

Используя этилацетат, было определено содержание трех монокофеилхиновых кислот и кофеина в трех различных напитках. Напиток, полученный из размолотых листьев мате, кофе растворимого (Jardin café éclair) и кофе молотого (Tchibo), табл.1.

Таблица 1 – Содержание монокофеилхинных кислот и кофеина в анализируемых образцах

№	Исходное сырье	Содержание, мг/100 мл (n = 5, p = 0.95)				
		3CQA	5CQA	4CQA	Сумма CQA	кофеин
1	Мате	64.3	30.9	19.9	115 ± 5	9.3 ± 0.3
2	Jardin café éclair	23.7	44.8	25.4	94 ± 5	22.9 ± 0.7
3	Tchibo (молотый)	20.1	34.6	23.2	78 ± 6	41.4 ± 0.3

Выводы. Таким образом, изопропанол и этилацетат могут быть экологически более благоприятной альтернативой ацетонитрила в рамках зеленой хроматографии при совместном присутствии кофеина и монокофеилхинных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ. Последовательная замена в ряду ацетонитрил – изопропиловый спирт – этилацетат приводит к

резкому уменьшению удерживания кофеина относительно изомерных монокофеоилхинных кислот.

ЦЕЧЁЕВ А.Т, КАРПЕНКО Ю.Н.
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ
КОЭФФИЦИЕНТА ЛИПОФИЛЬНОСТИ НОВОГО
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ С
ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Пермская государственная фармацевтическая академия, г. Пермь
e-mail: arthurtse@yandex.ru

TSECHEEV A.T, KARPENKO J.N.
**APPLYING OF THE HPLC METHOD IN THE DETERMINATION OF
THE PARTITION COEFFICIENT OF A NEW BIOLOGICALLY
ACTIVE COMPOUND WITH CYTOTOXIC ACTIVITY**

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm
e-mail: arthurtse@yandex.ru

Аннотация: в статье представлены результаты определения коэффициента липофильности нового биологически активного соединения с цитотоксической активностью методом «Shake Flask Method» с использованием разработанной методики на основе обращённо-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Abstract: the article presents the results of determining the lipophilicity coefficient of a new biologically active compound with cytotoxic activity by the Shake Flask Method using the developed technique based on reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

Ключевые слова: липофильность, биологически активное соединение, метод встряхивания, ВЭЖХ, log P.

Keywords: lipophilicity, biologically active compound, shake-flask method, RP-HPLC, log P.

Введение. Обеспечение населения современными, эффективными и безопасными лекарственными средствами – один из приоритетов государственной политики Российской Федерации. Залогом доступности качественной лекарственной помощи для потребителей является не только производство эффективных дженериков, но и разработка отечественных инновационных препаратов, содержащих новые действующие вещества [1]. В Пермской государственной фармацевтической академии под руководством профессора Игидова Н.М. синтезирован ряд производных 2-аминопирролов с высокой цитотоксической активностью, что

подтвердилось исследованиями на линиях опухолевых клеток [2]. Одно из наиболее активных соединений 1208И стало кандидатом для дальнейшего углубленного изучения.

Важным шагом в отборе кандидатов для дальнейшей разработки является выявление тех веществ, которые будут хорошо всасываться и распределяться в организме человека. Данные свойства веществ связаны их липофильностью, то есть мерой сродства к липидной среде. Чем выше липофильность соединения, тем больше его способность проникать через липидный слой клеточной мембраны. Для некоторых соединений наличие липофильных свойств является и необходимым условием проявления специфической фармакологической активности. Таким образом, липофильность имеет большое значение при разработке лекарственных средств, поскольку указывает на взаимосвязь лекарств с их биологическими, фармакокинетическими и метаболическими свойствами [4].

Количественной характеристикой липофильности является величина коэффициента распределения в системе н-октанол/вода ($\log P$). Для определения $\log P$ могут быть использованы теоретические (расчетные) и экспериментальные способы. Наиболее надежным методом экспериментального определения липофильности является «Shake Flask Method», предусматривающий измерение концентрации растворенного вещества в каждом из растворителей после установления равновесия.

Целью настоящего исследования являлась оценка липофильности нового биологически активного соединения с цитотоксической активностью 1208И методом встряхивания в колбе (Shake Flask Method). Для достижения поставленной цели предварительно необходимо было решить задачу по разработке экспрессной методики количественного определения 1208И на основе обращенно-фазного варианта ВЭЖХ.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали серию субстанции биологически активного соединения 1208И, синтезированную в ПГФА в марте 2021 года. Разработку методики количественного определения 1208И проводили на жидкостном хроматографе «LC-20 Prominence» (Shimadzu) с диоднолучным детектором SPD-M20A. Разделение осуществляли на хроматографической колонке Luna 5u C18(2) 100A (4,6 × 250 мм, 5 мкм).

Определение коэффициента липофильности ($\log P$) проводилось согласно руководству ОЭСР «Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method» [3]. Встряхивание проводили на универсальном вихревом смесителе MSV-3500. Эффективное разделение фаз обеспечивалось центрифугированием с помощью универсальной настольной центрифуги с охлаждением «Digicen 21R».

В качестве липофильной фазы использовался н-октанол (99%, Sigma, USA), а в качестве гидрофильной – вода очищенная. Из раствора

исследуемого вещества в метаноле (99%, Sigma, USA) с концентрацией 10 мг/мл было приготовлено 3 разведения с концентрациями 50, 100 и 150 мкг/мл, с водой очищенной в качестве растворителя. Соотношения органической и водной фаз (октанол/вода) составили 2:1; 1:1; 1:2.

В пробирку эппендорф объемом 2 мл помещали соответствующие объемы н-октанола и водного разведения исследуемого вещества (в 2 повторностях, всего 6 пробирок). Пробирки встряхивали в течение 5 минут со скоростью 900 об/мин, затем для наиболее полного разделения фаз центрифугировали в течение 10 минут на 15000 об/мин.

Водную фазу для расчета концентрации вещества забирали шприцем, помещали в виалу и хроматографировали при температуре термостата хроматографической колонки 40 °С со скоростью потока подвижной фазы 1 мл/мин, объем вкола – 10 мкл. Каждый образец хроматографировали дважды. Параллельно хроматографировали разведения, используя полученные площади пиков в качестве стандартных.

Расчёт коэффициента липофильности проводился по формуле из руководства [3] с учётом соотношения гидрофильной и липофильной фаз [5]:

$$\log P = \log \left(\frac{A_{st} - A_w}{A_w} * \frac{V_w}{V_o} \right)$$

где A_{st} – площадь пика вещества в стандартном растворе соответствующей концентрации, A_w – площадь пика вещества в водной фазе после их уравнивания, V_w – объем водной фазы, V_o – объем н-октанола. Каждое экспериментальное значение $\log P$ является средним четырёх последовательных измерений.

Результаты исследования и их обсуждение. На этапе разработки условий определения 1208И методом ВЭЖХ были опробованы элюенты на основе ацетонитрила, воды и фосфатных буферных растворов с рН 3,0 и 6,8. Соотношения компонентов в подвижных фазах варьировалось. Элюирование проводили при температуре термостата хроматографической колонки 40 °С, скорость потока элюента составляла 1 мл/мин.

В качестве длины волны детектирования была выбрана длина 258 нм, соответствующая максимальному поглощению исследуемого соединения. Установлено, что характер УФ-спектра не изменяется в зависимости от рН используемого элюента.

Проведенные исследования показали, что соединение 1208И хорошо удерживается в режиме обращенно-фазной ВЭЖХ. Оптимальные значения коэффициентов ёмкости наблюдались при содержании ацетонитрила в подвижной фазе от 50% до 35% при использовании всех апробированных элюентов. Фактор асимметрии хроматографического пика не превышал значения 1,5, рекомендованного ГФ РФ (XIV изд.).

Наиболее простая в приготовлении подвижная фаза состава вода – ацетонитрил (50:50) была выбрана для дальнейшего количественного

определения соединения 1208И в водной фазе при оценке его липофильности. Время удерживания 1208И в данных условиях составило $7,95 \pm 0,03$ мин (рис. 1).

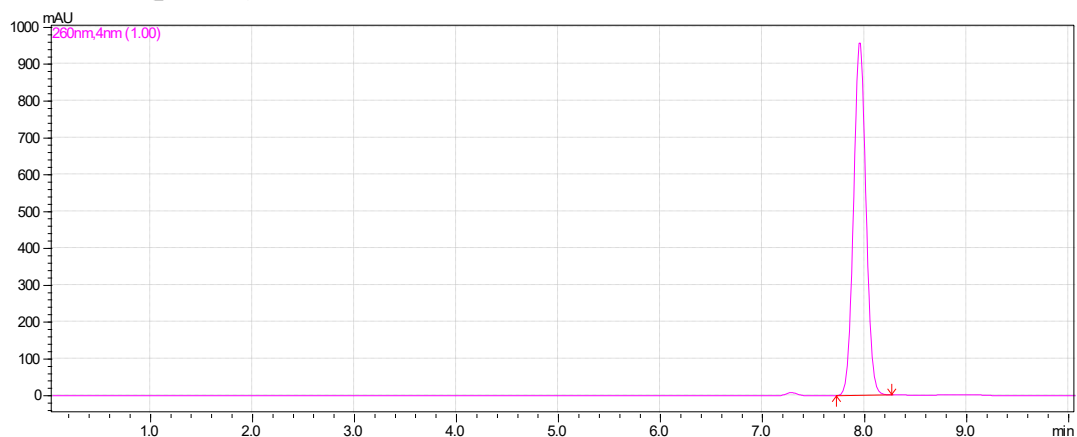


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора 1208И

Установлено, что линейность отклика спектрофотометрического детектора (площади хроматографического пика) от концентрации соединения в растворе соблюдается в широком диапазоне концентраций (1-500 мкг/мл), рассчитанный коэффициент корреляции составил более 0,999. Определение липофильности соединения 1208И проводили по указанной ранее методике. Экспериментально установленные значения $\log P$ представлены в таблице 1.

Таблица 1 Экспериментально установленные значения $\log P$ биологически активного соединения 1208И (Shake Flask Method)

Соотношение октанол/вода	1:1			2:1			1:2		
	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Концентрация соединения, мкг/мл	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Log P	1,35 \pm 0,03	1,32 \pm 0,01	1,22 \pm 0,02	1,55 \pm 0,09	1,51 \pm 0,03	1,56 \pm 0,02	1,64 \pm 0,03	1,92 \pm 0,01	1,84 \pm 0,06

Также нами был произведен теоретический расчет $\log P$ соединения 1208И с помощью доступных программ и сервисов (таблица 2).

Таблица 2 Теоретические значения $\log P$ биологически активного соединения 1208И

Программа/сервис	Значение
FILTER-IT program	1,92
Swiss ADME	1,61
ALOGPS 2.1 program	2,50
Molinspiration Calculator of Molecular properties	1,61

Выводы. Разработаны условия хроматографического определения нового биологически активного соединения 1208И методом ВЭЖХ-УФ:

- выбран состав ПФ, длина волны детектирования;
- установлена линейность отклика УФ-детектора от концентрации соединения в растворе.

Разработанная методика была использована для оценки липофильности 1208И методом «Shake-flask». Экспериментально полученные результаты соотносятся с теоретически рассчитанными значениями коэффициента липофильности $\log P$, что позволяет предположить достаточную биодоступность соединения 1208И при пероральном применении.

Список литературы

1. Чапленко А.А. Инновационные лекарственные препараты на российском фармацевтическом рынке: ключевые игроки и основные направления разработок / А.А. Чапленко, В.В. Власов, Г.Н. Гильдеева // РЕМЕДИУМ. – 2020. – №10. – С. 4-9.
2. Синтез и биологическая активность 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-п-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамидов / С. С. Зыкова, Н. М. Игидов, А. В. Захматов, [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 3. – С. 10-16.
3. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS / Adopted by the Council on 27th July 1995 // Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.
4. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients ($\log D$) from low drug amounts / Axel Andrés, Martí Rosés, Clara Ràfols [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2015. – Vol. 76. – pp. 181–191.
5. Podunavac-Kuzmanović S. O. The effect of lipophilicity on the antibacterial activity of some 1-benzylbenzimidazole derivatives / S. O. Podunavac-Kuzmanović, D. D. Cvetković, D. J Barna // Journal of the Serbian Chemical Society. – 2008. – Vol. 73 (10). – pp. 967–978.

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ВОЛКОВА Н.А., КУРКИН В.А., ПРАВДИВЦЕВА О.Е.
**ИЗУЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ В СЫРЬЕ БОЯРЫШНИКА**

Самарский государственный медицинский университет, г. Самара
E-mail: nadezhda_alexandrovna_1997@mail.ru

VOLKOVA N.A., KURKIN V.A., PRAVDIVTSEVA O.E.
**STUDY OF FLAVONOIDS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY IN
HAWTHORN RAW MATERIALS**

Samara State Medical University, Samara
E-mail: nadezhda_alexandrovna_1997@mail.ru

Аннотация: цветки и плоды боярышника успешно применяются в медицинской практике РФ в качестве средств для лечения кардиотонических заболеваний. Перспективными видами сырья боярышника являются листья и побеги. Исследование сырья боярышника показало, что для анализа цветков, листьев и побегов боярышника целесообразно использование тонкослойной хроматографии.

Abstract: hawthorn flowers and fruits are successfully used in the medical practice of the Russian Federation as a means for the treatment of cardiovascular diseases. Promising raw materials of hawthorn are leaves and cormus. The study of hawthorn raw materials has shown that the use of thin-layer chromatography is advisable for hawthorn flowers, leaves and cormus.

Ключевые слова: боярышник, *Crataegus* L., флавоноиды, тонкослойная хроматография.

Keywords: hawthorn, *Crataegus* L., flavonoids, thin-layer chromatography.

Актуальность. Цветки и плоды боярышника (*Crataegus* L.) успешно применяются в медицинской практике РФ в качестве средств для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Наиболее распространенными видами для заготовки сырья в РФ являются боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall.), и боярышник однопестичный (*Crataegus monogina* Jacq.). Также повсеместно культивируется большое количество видов растений рода Боярышник, среди которых наиболее популярен боярышник полумягкий (мягковатый) (*Crataegus submollis* Sarg.), родиной которого является Северная Америка [2]. Ранее нами в эксперименте были отмечены антидепрессантные свойства и диуретическая активность для жидких экстрактов из листьев и побегов боярышника полумягкого и боярышника кроваво-красного [3-5]. Ведущей группой биологически активных соединений сырья боярышника являются флавоноиды. Как показали проведенные нами ранее исследования, в листьях, цветках и

побегах боярышника преобладают окисленные формы флавоноидов (гиперозид, 2^{II}-О-рамнозида витексина, витексин и др.).

Целью исследования работы явилось сравнительное исследование флавоноидов в листьях, цветках и побегах боярышника однопестичного, боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого с помощью метода тонкослойной хроматографии.

Материалы и методы. Цветки, листья и побеги боярышника однопестичного, боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого были заготовлены на стадии цветения растения в мае 2021 года. Все виды сырья были заготовлены на территории Ботанического сада Самарского университета. После сбора сырье было высушено на воздухе без доступа прямых солнечных лучей.

Во всех видах сырья проводили сравнительное определение флавоноидов методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». С этой целью проводили экстракцию измельченного сырья с помощью 70% спирта этилового на кипящей водяной бане. В качестве системы растворителей была использована смесь растворителей хлороформ-этиловый спирт-вода в соотношении 26:14:3. Детекцию разделенных веществ проводили просматриванием хроматографических пластинок в УФ свете при длине волны 366 и 254 нм, а также последовательным проявлением растворами алюминия хлорида и диазобензолсульфокислоты. В качестве свидетелей использовали растворы стандартного образца (СО) гиперозида, рутина, 2^{II}-О-рамнозида витексина и хлорогеновой кислоты.

Результаты и их обсуждение. Из результатов исследования можно заметить, что сырье, представляющее собой цветки, практически идентично у всех трех видов боярышника. В цветках боярышника доминирует флавоноид гиперозид, а также содержится фенилпропаноид хлорогеновая кислота.

При этом листья и побеги разных видов боярышника сильно отличаются друг от друга по химическому составу. В листьях и цветущих побегах боярышника полумягкого преобладает гиперозид, в то время как в аналогичных видах сырья боярышника кроваво-красного доминирующим флавоноидом является 2^{II}-О-рамнозида витексина. Наличие небольшого количества 2^{II}-О-рамнозида витексина можно отметить в листьях и побегах боярышника полумягкого. В листьях и побегах боярышника кроваво-красного также находятся витексин и гиперозид. В то же время в листьях и цветущих побегах боярышника однопестичного обнаруживается доминирующее пятно на уровне СО рутина. Однако детекция в УФ-свете, а также окраска пятна после его проявления не соответствует этому флавоноиду. Также ранее нами было отмечено, что максимум дифференциальной кривой поглощения при исследовании извлечения из листьев и побегов боярышника однопестичного составляет 392±2 нм.

Также можно отметить наличие характерных пятен у извлечений листьев и побегов боярышника однопестичного и боярышника кроваво-красного с R_f около 0,3 и 0,2 соответственно. Анализ, проведенный методом хроматоспектрофотометрией показал, что максимумы поглощения обоих веществ составляют 270 и 330 нм, что характерно для флавоноидов, относящихся к производным апигенина. Кроме того, в листьях и побегах всех исследуемых видов боярышника отмечается содержание хлорогеновой кислоты.

Выводы. Цветки, листья, побеги боярышника отличаются по содержанию флавоноидов. Цветки всех трех видов боярышника аналогичны друг другу по химическому составу. Листья и побеги боярышника одного вида содержат одинаковые биологически активные соединения. Аналогичные виды сырья боярышника разных видов имеют много отличий друг от друга, при этом, на наш взгляд, являются перспективными видами сырья. Боярышник полумягкий является перспективным видом лекарственных растений.

Список литературы

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. - Четырнадцатое издание. – М.: Министерство здравоохранения РФ, 2018. / URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
2. Деревья и кустарники СССР. Т. 3, Издание Академии наук СССР Москва-Ленинград, 1954. – 872 с.
3. Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Шайхутдинов И.Х., Куркина А.В., Зайцева Е.Н., Волкова Н.А. Виды рода боярышник (*Crataegus* L.): стандартизация и создание лекарственных препаратов. - Самара: ООО «Офорт», 2020. – 118 с.
4. Морозова Т.В., Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Розно С.А., Жавкина Т.М. Сравнительное фитохимическое исследование плодов, побегов и цветков некоторых видов рода боярышник // Аспирантский вестник Поволжья. - 2018. - № 1-2. - С. 22-24.
5. Морозова Т.В., Куркин В.А., Зайцева Е.Н., Правдивцева О.Е., Дубищев А.В., Афанасьева П.В., Кретова А.А., Гамирова Г.Ф. Изучение антидепрессантных свойств жидких экстрактов на основе сырья боярышника полумягкого // Вестник Башкирского государственного медицинского университета (сетевое издание). - 2018. - № 4. - С. 150-155.

ГОЛОВИНА Н.В., ДОБРОХОТОВ Д.А., НЕСТЕРОВА О.В.,
ФИЛИППОВА А.А., ГАРНОВА Н.Ю.
**СОЗДАНИЕ УНИФИЦИРОВАННОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ РАЗЛИЧНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
ДЛЯ СТУДЕНЧЕСКОГО ПРАКТИКУМА В РАМКАХ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ
ВУЗОВ**

*Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский университет)
E-mail: dobrokhotov_d_a@staff.sechenov.ru*

GOLOVINA N.V., DOBROKHOTOV D.A., NESTEROVA O.V.,
FILIPPOVA A.A., GARNOVA N.YU.
**CREATION OF A UNIFIED METHOD FOR DETERMINING THE
AMINO ACID COMPOSITION OF PROTEINS OF VARIOUS ORIGINS
BY PAPER CHROMATOGRAPHY FOR A STUDENT WORKSHOP
WITHIN THE EDUCATIONAL PROGRAM FOR MEDICAL
UNIVERSITIES**

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M.
Sechenov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov
University)
E-mail: dobrokhotov_d_a@staff.sechenov.ru*

Аннотация. Авторами представлена унифицированная методика, которая позволяет методом восходящей бумажной хроматографии определить качественный аминокислотный состав белков растительного и животного происхождения. Методика является достаточно простой и оптимальной для определения аминокислот, чтобы ее можно было с успехом использовать и применять в студенческом практикуме.

Annotation. The authors presented a unified technique that allows the method of ascending paper chromatography to determine the qualitative amino acid composition of proteins of plant and animal origin. The technique is simple and optimal enough for the determination of amino acids so that it can be successfully used and applied in a student's workshop.

Ключевые слова: бумажная хроматография, белки, экстракция, аминокислота

Keywords: paper chromatography, proteins, extraction, amino acid.

В данной работе представлена методическая разработка качественного определения аминокислот в яичном белке, а также в корнях

и листьях сельдерея и в плодах зеленой фасоли методом бумажной восходящей хроматографии. Важным фрагментом исследования нашей работы явилось изучение методов экстракции белков из растительного сырья, а также использование экстракции, с выбором детектирующих реагентов.

Целью работы явилось создание унифицированной методики по определению качественного определения аминокислот в яичном белке, а также в корнях и листьях сельдерея, а также в плодах зеленой фасоли методом бумажной восходящей хроматографии. Важным этапом данной работы явился этап отработки методов экстракции белков и получение достаточно качественных белковых гидролизатов.

Оборудование и реактивы. Хроматографическая камера, хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, бутиловый спирт, воронки, чашки Петри, раствор хлороводородной кислоты концентрированный; вода дистиллированная, концентрированная уксусная кислота, этанол, спиртовые растворы нингидрина и β -нафтола, фарфоровые ступки и пестики, фарфоровые чашки, опрыскиватели.

Материалы и методы. На хроматографическую бумагу наносили капилляром растворы яичного белка ($w = 50\%$, $w = 100\%$) и сок листьев сельдерея, спирто-водные экстракты корня сельдерея и плодов зеленой фасоли. Для экстракции использовались следующие реагенты: смешанный раствор этанола, уксусной кислоты и воды. Гидролизаты экстрактов наносили на узкие полоски хроматографической бумаги на расстоянии 1,0–1,5 см от края [1]. Затем, данные полоски бумаги помещали в хроматографические камеры с растворителями (вода, бутанол), погружая полоски бумаги - 2-5мм. Так, чтобы бумага едва касалась растворителя. Поднятие растворителей до «линии фронта» (7-8мм) позволяло вынимать полоски из хроматографических камер и высушивать их или в сушильном шкафу, или на воздухе. Высушенные, полученные хроматограммы помещали на 30 секунд в фарфоровую чашку, погружая их в проявители (спиртовые растворы нингидрина (0,75моль/л) и β -нафтола (0,15моль/л). Некоторые хроматограммы опрыскивали из пульверизаторов и затем слегка нагревали.

Основной качественной характеристикой вещества - положение его зоны на бумаге, является фактор R_f (коэффициент распределения). $R_f = L / F$, где L – отношение расстояния от линии «старта» (места нанесения аминокислоты до середины пятна, а F – расстояние от линии «старта» до линии фронта, пройденного растворителем [2].

На основании полученных данных на хроматограммах, рассчитывали значение коэффициента распределения, отмечали число окрашенных зон, и сравнивали с табличными данными, определяя какая из них соответствует какой аминокислот (таб. 1).

Таблица 1 – Значение R_f отдельных аминокислот [2]

Аминокислоты	Растворители	
	Фенол, насыщенный водой	Н-бутиловый спирт-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:1)
Фенилаланин	0,87	0,66
Лизин	0,82	0,16
Аргинин	0,90	0,18
Гистидин	0,69	0,17
Серин	0,36	0,32
Треонин	0,47	0,36
Глицин	0,41	0,34
Аспарагиновая кислота	0,15	0,33
Глютаминовая кислота	0,25	0,37
Тирозин	0,63	0,53
α -аланин	0,56	0,39
Метионин	0,83	0,58
Триптофан	0,75	0,62
Пролин	0,89	0,50
Лейцин	0,87	0,72
Валин	0,76	0,56
Цистин	0,03	0,13

Результаты и обсуждение.

- в системе: яичный белок (50%)+ бутанол + β -нафтол полученные данные соответствовали **серину и треонину**;
- в системе: яичный белок (100%)+ бутанол + нингидрин были обнаружены **лизин, серин, треонин, цистеин**;
- в системе: сельдерей (сок листьев) + уксусная кислота + дистиллированная вода+ 2-нафтолокрашенная зона соответствовала **гистидину**;
- в системе: сельдерей (сок листьев) + HCl(конц.) + дистиллированная вода +нингидрин были обнаружены **следы гистидина и треонина**;
- в системе: сельдерей (экстракт корня) + HCl(конц.) + дистиллированная вода + нингидрин данные соответствуют **лизину и цистеину**;
- в системе: зеленая фасоль(экстракт плодов) + уксусная кислота + дистиллированная вода + β -нафтол были обнаружены **глицин и следы тирозина** ;

Относительная ошибка измерения в среднем по всем опытам составила 3,81%.

Выводы, при использовании данной методики, можно сделать следующие:

1. Эту методику можно применять для качественного обнаружения аминокислот в сырье животного и растительного происхождения.

2. В яичном белке были обнаружены следующие аминокислоты: серин, треонин, лизин, цистеин.

3. В растительном сырье (листьях, корнях сельдерея и плодах зеленой фасоли) при использовании данной методики не все результаты являются качественными и достоверными, т.к. на некоторые хроматограммы имеют не четкие окрашенные зоны, а размытые пятна, не имеющие контуров. Скорее всего, это связано с процессом экстрагирования белков из сырья и получением гидролизатов, поэтому экстракция нуждается в доработке [3].

4. Создав данную методику, авторы считают, что она представляет собой интерес и является оптимальным вариантом для введения в студенческий лабораторный практикум, где должны сочетаться навыки по освоению методов экстракции и бумажной хроматографии.

Список литературы

1. Головина Н.В., Филиппова А.А., Макарьянц Л.Д., Панкова В.Д. Определение аминокислотного состава белков различного происхождения методом бумажной хроматографии. Сб. статей IV Международной научно-практической конференции. Пенза, 2018
2. Н. В. Головина, Д.А. Доброхотов, В.А. Попков «Руководство к практическим и лабораторным занятиям по курсу «Химия биополимеров» для студентов медицинских вузов».- Москва, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 2015, 104с.
3. А. Н. Ибрагимов, А. Г. Бикмуллин, Д. А. Сатаева, Л. В. Лопухов. «Хроматографические методы очистки белков»- Казань 2013г, 48с.

¹ГРИШАЕВА О.В., ^{1,2}ЕГОРОВА И.Н., ¹ГОРБУШИНА И.С.
**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАРОТИНОИДОВ РАЗЛИЧНЫХ
СОРТОВ ТЫКВЫ МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

¹Кемеровский государственный медицинский университет, г. Кемерово

²Лаборатория рекультивации и биомониторинга

Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, г Кемерово

e-mail.ru: grishaeva.ov@mail.ru

¹GRISHAEVA O.V., ^{1,2}EGOROVA I.N., ¹GORBUSHINA I. S.
**COMPARATIVE ANALYSIS OF CAROTENOIDS OF VARIOUS
PUMPKIN VARIETIES BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AND
SPECTROPHOTOMETRY**

¹Kemerovo State Medical University, Kemerovo

²Reclamation and biomonitoring laboratories

Institute of Human Ecology, FIC UUH SB RAS, Kemerovo

e-mail.ru: grishaeva.ov@mail.ru

Аннотация: Целью исследования явился сравнительный анализ каротиноидов различных отечественных сортов тыкв с помощью качественных (тонкослойная хроматография, УФ-спектроскопия) и количественных методов анализа.

Abstract: The aim of the study was a comparative analysis of carotenoids of various domestic pumpkin varieties using qualitative (thin-layer chromatography, UV spectroscopy) and quantitative methods of analysis.

Ключевые слова: каротиноиды, тыква, методы, тонкослойная хроматография, УФ-спектрофотометрия.

Keywords: carotenoids, pumpkin, methods, thin-layer chromatography, UV spectrophotometry.

К группе биологически активных соединений, с высокой антиоксидантной активностью, относятся каротиноиды, которые обладают кардиопротекторным, антиатерогенным и антиканцерогенным свойствами, также оказывают иммуномодулирующее, фотозащитное и радиопротекторное действие. Каротиноидами прежде всего богаты овощи, а в частности окрашенные в оранжевый цвет. К таким овощам относится и тыква [1,2].

Тыква (Cucurbita), является не только ценной пищевой, но и лекарственной, и кормовой культурой. Она нашла широкое применение в национальных кухнях многих стран мира, а также используется в качестве сырья для пищевой промышленности (варенье, пюре, сок и др.) и в фармацевтической, для производства лекарств ("Тыквеол", "Тыквит" и др.). В последние годы к тыкве проявляется большой интерес, как к сырью,

используемому для производства различных функциональных продуктов, так как давно известно, об эффективности ее использования в предотвращении онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний и ожирения [3]. Поэтому работа современных селекционеров направлена, прежде всего на создание новых сортов тыкв с высоким содержанием биологически активных соединений, в том числе и каротиноидов [6]. Надо отметить, что разные сорта могут иметь различный каротиноидный состав: β -каротин, виолаксантин, кукурбитаксантин, α -крипноксантин, β -крипноксантин, лютеин, зеаксантин, неоксантин и другие [6,7].

Цель исследования - сравнительный анализ каротиноидов в некоторых отечественных сортах тыкв (*Cucurbita*).

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования были выбраны 3 сорта тыкв, выращенных на опытном участке Кузбасского ботанического сада института Экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН: «Банановая 42», «Мраморная», «Витаминная».

Для анализа отбиралась мякоть от зрелых не поврежденных тыкв в количестве 5 г. Мякоть измельчали и подвергали трехкратному экстрагированию гексаном в соотношении 1:5. Экстрагирование проводили при комнатной температуре до обесцвечивания мякоти. Колбы, в которых проводили экстракцию, обворачивали фольгой, для уменьшения воздействия света на каротиноиды, так они являются светочувствительными соединениями. Полученные порции извлечений объединяли и подвергали качественному анализу. Исследуемые пробы помещали в банки из оранжевого стекла и хранили в темном месте.

Разделение суммы каротиноидов полученных гексановых экстрактов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и методом УФ-спектрофотометрии [8].

На хроматографическую пластинку наносили по 5 мкл полученных извлечений и по 2 мкл раствора сравнения, в качестве которого использовался препарат «Веторон», содержащий β -каротин.

Хроматографическое разделение осуществлялась в системах подвижных фаз: 1 - гексан - бензол (29: 1); 2- чистый хлороформ; 3 - чистый гексан; 4- гексан – диэтиловый эфир (3: 7); 5- гексан – диэтиловый эфир (7: 1); 6- гексан – диэтиловый эфир (10: 1); 7- гексан – ацетон (7: 3); 8 - гексан – хлороформ (10: 1); 9- гексан – хлороформ (10: 0,5); 10- гексан – хлороформ (20: 0,2). Использовали хроматографические пластинки «Sorbfil». Проявляли пластинки 10 % раствором кислоты фосфорномолибденовой, после чего нагревали до 60 °С в течение 10 мин. Проявившиеся пятна синего цвета на зелено-желтом фоне, соответствовали зонам адсорбции, соответствующие каротиноидам [8].

Для спектрофотометрического анализа брали по 1 мл гексанового извлечения, который помещали в мерные колбы на 25 мл и доводили объем до метки гексаном. Для исследования использовали спектрофотометре СФ-

2000 (Россия). Спектры поглощения регистрировали в диапазоне от 250 до 700 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм, в качестве растворов сравнения использовали гексан.

Определение влажности образцов мякоти тыквы осуществляли методом термогравиметрии в соответствии с ГОСТом 28561-90. Количественное содержание суммарных каротиноидов определяли методом спектрофотометрии по ГОСТу Р 54058-2010.

Эксперименты ставили в трёхкратной повторности. Статистическую обработку результатов исследования проводили согласно общим требованиям ОФС.1.1.0013.15, с применением стандартной программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе проведения исследования по установлению лучшей подвижной фазы для разделения каротиноидов на пластинках «Сорбфил», было установлено, что наибольшей селективностью обладает система - гексан - хлороформ в соотношении 20: 0,2.

Анализ гексановых извлечений методом ТСХ в данной системе выявил наличие разных каротиноидов в изучаемых сортах тыкв. Так, у тыквы сорта «Витаминная» обнаружено наличие α - и β -каротинов, у сорта «Мраморная» и «Банановая 42» – только β -каротин (табл.1).

Таблица 1 – Характеристики УФ-спектров гексановых извлечений сортов тыкв

№	сорт	max, нм	D max
1.	Витаминная	424	424 (0, 76)
		445	445 (0, 816)
		471	471 (0, 707)
2.	Мраморная	422	422 (0, 382)
		443	443 (0, 504)
		471	471 (0, 445)
3.	Банановая 42	424	424 (1, 47)
		445	445 (1, 46)
		473	473 (1, 23)

Как известно из литературных источников, УФ-спектры поглощения для стандартных растворов каротиноидов имеют три или два максимума с одним плечом в области от 270 до 500 нм [9].

Спектр поглощения извлечений из мякоти исследуемых сортов тыкв: «Витаминная», «Банановая 42», «Мраморная» в области, присущей каротиноидам (426, 447, 472 нм) содержал три максимума (рис.1).

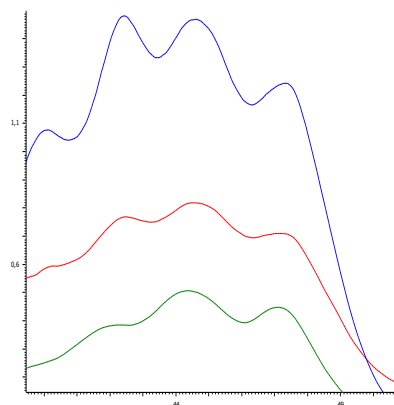


Рисунок 1 – УФ-спектр гексанового извлечения из мякоти образцов тыкв: 1 – сорт тыквы «Витаминная»; 2 – сорт тыквы «Банановая 42»; 3 – сорт тыквы «Мраморная».

Количественный анализ содержания суммарных каротиноидов в образцах мякоти тыкв показал, что тыква сорта «Витаминная» обладает самым высоким их содержанием – 2,7 мг/кг; «Банановая 42» - 1,3 мг/кг и «Мраморная» - 0,84 мг/кг.

Среди сравниваемых образцов по влажности тыква сорта «Витаминная» имеет влажность 92,5%; «Банановая 42» - 91,5% и «Мраморная» - 82,4%.

Выводы. Проведенный сравнительный анализ отечественных сортов тыкв показал, что они имеют различный качественный состав и количественное содержание каротиноидов. Тыква сорта «Витаминная» отличается от других сортов не только наличием α - и β -каротинов, но и повышенным содержанием суммарных каротиноидов.

Список литературы

1. Sharma, S. Rao Nutritional quality characteristics of pumpkin fruit as revealed by its biochemical analysis / S. Sharma // *Int. Food Res. J.* – 2013. – V.20 (5). – P. 2309-2316.
2. Elkhateeb, A. Biochemical importance of pumpkin fruit. *Applied Application* / A. Elkhateeb // Lambert Acad. Publ-2011.
3. Биологически активные соединения овощей / Н. А. Голубкина, С. М. Сирота, В. Ф. Пивоваров и др. – М.: ВНИИССОК, 2012.
4. Nutritive and mineral composition in collection of *Cucurbita pepo* L. grown in Kocova / Aliu S., Rusinovci I., Fetahu S. et al. // *Food Nutr. Sci.* – 2012. – V. three. – P. 634-638.
5. Loy, J. B. Morpho-physiological aspects of productivity and quality in squash and Pumpkins (*Cucurbita* spp.) / J. B. Loy // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2004. – V.23 (4). – P. 337-363.

6. Короцева И.Б., Химич Г.А. Основные направления и задачи селекции тыквенных культур. Овощи России. 2013;(2):17-21

7. Дейнека, Л.А. Исследование каротиноидного состава мякоти тыкв // Л.А. Дейнека, И.А. Гостищев, В.И. Дейнека, М.Ю. Третьяков, А.А. Сиротин / Научные ведомости. Серия Естественные науки, 2011. - №9 (104). - Вып.15. – С.131-136.

8. Курегян А.Г. Изучение каротиноидов тыквы методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии // Современные проблемы науки и образования. 2015. Вып. №1-2.

9. Ландина Л.Н. Стандартизация сухого экстракта сока мякоти тыквы, обладающего гиполипидемическим действием по содержанию β-каротина // Медицина, 2021. - №9(1). - С. 79-92.

**¹ЕГОРОВА Н.О., ^{2,3}ЕГОРОВА И.Н., ³МАЛЬЦЕВА Е.М., ³СУХИХ А.С.
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ФЛАВАН-3-ОЛОВ И
ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ В КОРНЕВИЩАХ С
КОРНЯМИ КРОВОХЛЁБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ И
ТОНКОЛИСТНОЙ МЕТОДОМ ТСХ С ДЕНСИТОМЕТРИЕЙ**

¹ЭКЦ ГУВД МВД России по Кемеровской области

²Лаборатория рекультивации и биомониторинга

Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, г Кемерово²

³Кемеровский государственный медицинский университет, г. Кемерово

E-mail: n.o.egorova@mail.ru

**¹EGOROVA N.O., ^{2,3}EGOROVA I.N., ³MALTSEVA E.M., ³SUKHIKH A.S.
COMPARATIVE ANALYSIS OF THE FLAVAN-3-OLS AND
OLIGOMERIC PROANTOCYANIDINES PROFILE IN SANGUISORBA
OFFICINALIS AND TENUIFOLIA RHIZOME WITH ROOTS BY
TLC- DENSITOMETRY METHOD**

¹Kemerovo region forensic science center

²Reclamation and biomonitoring laboratories

Institute of Human Ecology, FIC UUH SB RAS, Kemerovo²

³Kemerovo State Medical University, Kemerovo

E-mail: n.o.egorova@mail.ru

Аннотация: Растения рода *Sanguisorba* являются перспективными источниками ценных биологически активных соединений, в частности олигомерных проантоцианидинов. Эта группа полифенолов привлекает внимание ученых в связи с обнаружением антибактериальной, противовоспалительной, противоопухолевой, иммуностимулирующей, ранозаживляющей и антиоксидантной активности. С целью расширения

ресурсной базы необходимо дальнейшее изучение различных дикорастущих и интродуцированных видов кровохлёбок. Сравнительный качественный и количественный анализ олигомерных проантоцианидинов, проведенный методом ТСХ с денситометрией, показал существенные различия в профиле олигомерных проантоцианидинов и мономерных флаван-3-олов между *Sanguisorba officinalis* и *Sanguisorba tenuifolia*.

Abstract: Plants of the genus *Sanguisorba* are promising sources of valuable biologically active compounds, oligomeric proanthocyanidins. This group of polyphenols attracts the attention of scientists in connection with the discovery of antibacterial, anti-inflammatory, antitumor, immunostimulating, wound-healing and antioxidant activities. To expand the resource base, it is necessary to further study various wild and introduced species of burnet. Comparative qualitative and quantitative analysis of oligomeric proanthocyanidins, carried out by TLC with densitometry, showed significant differences in the profiles of oligomeric proanthocyanidins and monomeric flavan-3-ols between *Sanguisorba officinalis* and *Sanguisorba tenuifolia*.

Ключевые слова: кровохлёбка лекарственная, кровохлёбка тонколистная, олигомерные проантоцианидины, флаван-3-олы, тонкослойная хроматография с денситометрией.

Keywords: *Sanguisorba officinalis*, *Sanguisorba tenuifolia*, oligomeric proanthocyanidins, flavan-3-ols, thin-layer chromatography with densitometry.

Актуальность. Тонкослойная хроматография (ТСХ) – это метод быстрого скрининга для разделения и идентификации биологически активных соединений (БАС) в растительных экстрактах. ТСХ обладает уникальными преимуществами по сравнению с другими хроматографическими методами, такими как ВЭЖХ, ГХ и капиллярным электрофорезом, которые обладают более высокими возможностями эффективности и селективности разделения сложных смесей БАС. Этот метод часто используется для точного и надежного качественного и количественного анализа, который характеризуется относительно низкими эксплуатационными расходами и коротким временем анализа, а также простотой исполнения [1]. Количественный анализ может быть выполнен после разделения БАС и проявления хроматограмм, с последующим анализом изображений методом денситометрии. Анализ изображений хроматограмм с использованием компьютерной программной технологии рассматривался как простой, недорогой и удобный метод количественного определения с хорошей селективностью и точностью в анализе БАС как в растительных лекарственных препаратах, так и в лекарственном растительном сырье.

Данный метод используется для изучения БАС у представителей семейства Розоцветных (Rosaceae), рода Кровохлебка (*Sanguisorba*) кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L.) и кровохлебки

тонколистной (*Sanguisorba tenuifolia* L.). Кровохлебка лекарственная широко распространена на территории Кемеровской области-Кузбасса, кровохлебка тонколистная отмечена в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке. Однако, в культуре данный вид, на территории Кузбасского ботанического сада ФИЦ УУХ СО РАН, проявил достаточную устойчивость к экстремальным условиям резко-континентального климата лесостепной зоны Западной Сибири, а также к вредителям и болезням. Проведенные ранее исследования, выявили достаточное содержание дубильных веществ, как в кровохлебке лекарственной, так и в тонколистной, выращенных в условиях культуры [2,3]. Жители Северо-Восточного Китая считают *S. tenuifolia* заменителем *S. officinalis* и применяют ее корневища и корни для лечения диареи, хронических кишечных инфекций, язв двенадцатиперстной кишки, сахарного диабета и кровотечений. Исследования китайских ученых [4] показали, что этилацетатная фракция этанольного экстракта корневища *S. tenuifolia* содержит большое количество тритерпенов, которые проявляют свойства α -ингибиторов глюкозидазы и влияют на уровень глюкозы в плазме крови у крыс с диабетом, вызванным аллоксаном. Сведений о качественном и количественном составе флаван-3-олов и ОПАЦ в доступной литературе нами не обнаружено.

Целью работы являлось сравнительное изучение качественного и количественного состава флаван-3-олов и олигомерных проантоцианидинов (ОПАЦ) в корневищах с корнями кровохлебки лекарственной и кровохлебки тонколистной с помощью метода тонкослойной хроматографии с денситометрией.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись корневища и корни кровохлебки лекарственной (КЛ) и кровохлебки тонколистной (КТл), заготовленные на опытном участке Кузбасского ботанического сада осенью 2021 года. Сырье подвергали обработке и сушили воздушно-теневым способом.

Выделение ОПАЦ и КХ осуществляли методом мацерации измельченного растительного сырья с помощью 70% ацетона (1:10) в течение 5 дней в темном месте.

Сравнительное определение ОПАЦ и КХ в сырье проводили методом ТСХ на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». Использовали денситометр с осветительной камерой Сорбфил КС 4.00.000 в условиях освещения лампами DULUX 7W/21 840 OSRAM (белого света) с системой фотофиксации Sony (Handycam HDR-CX405) и ТВ тюнером EasyCap (ООО «ИМИД», Россия). Обработку изображения осуществляли с применением ПО Sorbfil TLC View.

На пластинку наносили 30 мкл полученного извлечения и 2 мкл 0,01% водно-ацетонового раствора эпигаллокатехингаллата (ЭГКГ, Sigma-Aldrich). Хроматографическое разделение осуществлялась в системах

подвижных фаз (ПФ) толуол – ацетон – муравьиная кислота в различных соотношениях: I – 3:6:1 об/об, II – 6:6:1 об/об и III – 3:3:1 об/об. Проявление хроматограмм осуществлялась смесью 1% раствора ванилина и 9М раствором серной кислоты в этаноле, приготовленной *in situ*. После обработки пластины нагревали при температуре 100° С в течение 10–15 минут.

Эксперименты проводили в трёхкратной повторности. Содержание КХ и ОПАЦ проводили методом внутренней нормализации. Статистическую обработку результатов измерения проводили согласно требованиям ОФС.1.1.0013.15 с применением стандартной программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. В результате экспериментов по подбору ПФ для разделения КХ и ОПАЦ на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» установлено, что лучшей эффективностью и селективностью разделения компонентов сложной смеси мономеров и полимерных форм ПАЦ обладает ПФ II – толуол – ацетон – муравьиная кислота(6:6:1об/об) (рис.1).

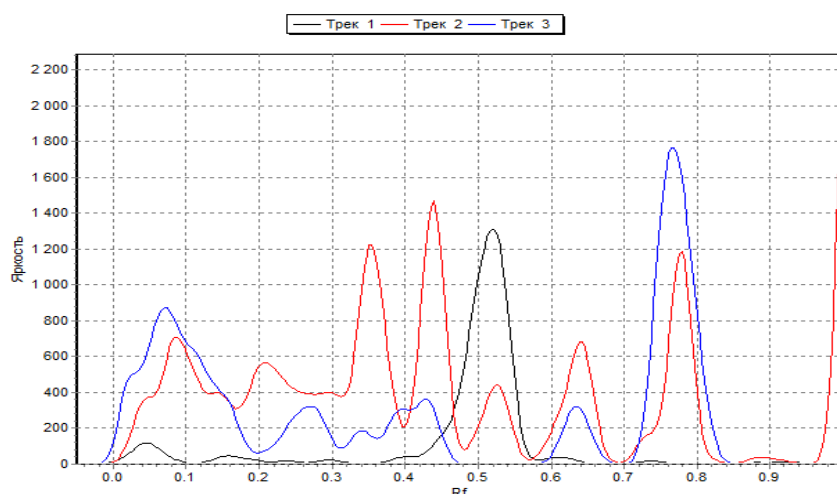


Рисунок 1 –Денситограмма хроматографического разделения 30 мкл 70% водно-вцетоновых извлечений корневищ с корнями *Sanguisorba officinalis* (красная линия) и *Sanguisorba tenuifolia* (синяя линия)на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». ПФ: толуол – ацетон – муравьиная кислота (6:6:1об/об). СОВС – 2 мкл 0,01% раствора эпигаллокатехингаллата (черная линия).

На хроматограмме наблюдается выраженная зона адсорбции СОВС ЭГКГ с Rf 0,52. Эта же зона присутствует на хроматограмме извлечения КЛ и полностью отсутствует у образца КТл.

Согласно литературным данным [5] зоны адсорбции над ЭГКГ принадлежат флаван-3-олам (мономерным единицам ОПАЦ), в нашем случае эпигаллокатехину (Rf 0,64) и эпикатехину (Rf 0,78). На хроматограмме извлечения КЛ и КТл наблюдаются оба мономера.

Количественное содержание трех мономерных производных флаван-3-ола в изученном образце КЛ составляет $29,4 \pm 0,53\%$. На хроматограмме образца КТл более выражена зона эпикатехина и количество двух мономеров составляет $45,2 \pm 0,73\%$.

На хроматограмме образца КЛ под зоной СОВС ЭГКГ наблюдаются зоны адсорбции димеров ОПАЦ – проантоцианидина В1 и В2, которые не выражены в образце КТл. Общее содержание димерных форм корневище с корнями КЛ составило $33,9 \pm 0,03\%$. Содержание три-, тетра- и пентамерных и более форм ОПАЦ составило в образцах КЛ и КТл $36,7 \pm 0,95\%$ и $52 \pm 0,32\%$ соответственно.

Выводы. Корневища и корни изученных видов кровохлёбок оказались богатым источником флаван-3-олов и олигомерных проантоцианидинов, с самым высоким содержанием в *S. officinalis* L. и самым низким в *S. tenuifolia*. Основными БАС КТл являются высокополимерные формы ПАЦ. Профиль флаван-3-олов этих двух видов отличается по наличию ЭГКГ.

Список литературы

1. Миназова Г.И. Тонкослойная хроматография в анализе природного сырья // Башкирский химический журнал. – 2010. – Том 17. – № 5. – С.105-107
2. Егорова Н.О. Содержание дубильных веществ в надземных и подземных частях из флоры Кемеровской области // В сборнике: Развитие – 2019. Научное электронное издание. – 2019. – С. 231-238.
3. Егорова Н.О., Шереметова С.А. Некоторые показатели качества сырья кровохлебки лекарственной, в условиях культуры в Кузбасском ботаническом саду // В сборнике: Инновационный конвент "Кузбасс: образование, наука, инновации". Материалы Инновационного конвента. Департамент молодежной политики и спорта Кемеровской области. – 2019. – С. 436 - 438.
4. Kuang HX, Li HW, Wang QH, Yang BY, Wang ZB, Xia YG. Triterpenoids from the roots of *Sanguisorba tenuifolia* var. *Alba* // *Molecules*. – 2011. – Vol.16, №6. – P.4642-4651. doi:10.3390/molecules16064642
5. Bensa M, Glavnik V, Vovk I. Flavan-3-ols and Proanthocyanidins in Japanese, Bohemian and Giant Knotweed // *Plants (Basel)*. – 2021. Vol.10, № 2. – P.402. doi:10.3390/plants10020402

ЛОЗЮК Ю.Г., ТАРАСОВА Е.Е., ХАНЧЕВСКИЙ М.А.
ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДНОГО И СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТОВ
РОМАШКИ И ЗВЕРБОЯ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ

*Международный государственный институт имени А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Республика Беларусь,
г. Минск
e-mail: yulialozyuk16@gmail.com*

LOZYUK YU.G., TARASOVA E.E., KHANCHEVSKIY M. A.
RESEARCH OF WATER AND ALCOHOLIC EXTRACTS OF
CHAMOMILE AND STEAMIC BY THIN-LAYER
CHROMATOGRAPHY

*Belarusian State University, ISEI BSU, Republic of Belarus, Minsk
e-mail: yulialozyuk16@gmail.com*

Аннотация: проанализированы водный и спиртовой экстракты ромашки и зверобоя, проведена тонкослойная хроматография данных экстрактов. Выявлены наилучшие системы для разделения компонентов среды.

Abstract: the aqueous and alcoholic extracts of chamomile and steamic were analyzed by thin-layer chromatography. During these experiences the best systems for separation of the substances in extracts were determined.

Ключевые слова: водный экстракт, спиртовой экстракт, ромашка зверобой, тонкослойная хроматография, элюент, система, хроматограмма.

Keywords: aqueous extract, alcoholic extract, chamomile and steamic, thin-layer chromatography, eluent, system, chromatogram.

Цель исследования. Изучить методом тонкослойной хроматографии состав водных и спиртовых экстрактов ромашки и зверобоя, подобрать наилучшие элюирующие системы для тонкослойной хроматографии с целью разделения веществ в составе экстрактов.

Материалы и методы исследования. Спиртовой и водный экстракты ромашки и зверобоя, тонкослойная хроматография, экстракция.

Результаты исследования и их обсуждение. Для исследования были выбраны лекарственные растения ромашка и зверобой, как наиболее часто используемые в клинической практике для лечения заболеваний верхних дыхательных путей. Были приготовлены водные и спиртовые экстракты ромашки и зверобоя (рисунок 1). Забор проб экстрактов в процессе экстрагирования осуществлялся через 20, 40, и 60 минут для выбора более оптимальной концентрации экстрактов.

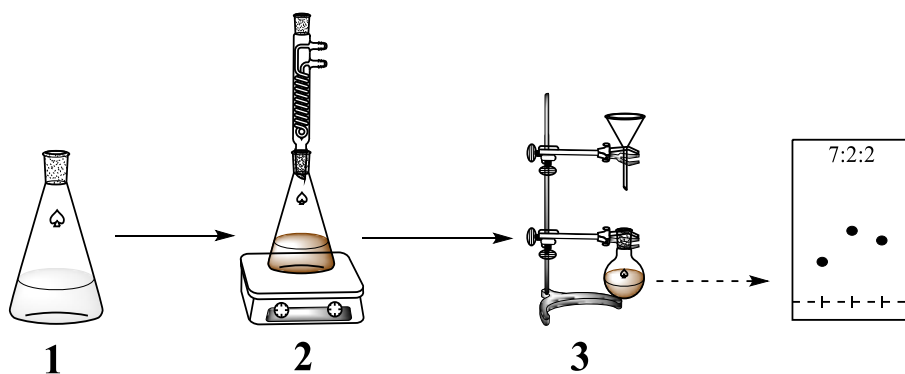


Рисунок 1 – Схема экстракции (1 – настаивание в течение 30 минут, 2 – экстракция при 60° С в течении часа, 3 – фильтрация полученного экстракта)

Для разделения веществ использовали метод восходящей ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck).

В качестве подвижной фазы использовали следующие растворители:

- А. Хлороформ (CHCl₃) – метанол (MeOH) в соотношении 4:1;
- В. Хлороформ (CHCl₃) – метанол (MeOH) в соотношении 9:1;
- С. Изопропанол (iso-PrOH) – гидрат аммиака (NH₄OH) – вода (H₂O) в соотношении 7:2:2;
- Д. Хлороформ (CHCl₃) – этанол (96% C₂H₅OH) – вода (H₂O) в соотношении 26:16:3.

Результаты разделения методом тонкослойной хроматографии спиртовых экстрактов ромашки, зверобоя в различных системах по три пробы в зависимости от времени забора (20, 40, 60 мин) представлены на рисунке 2.

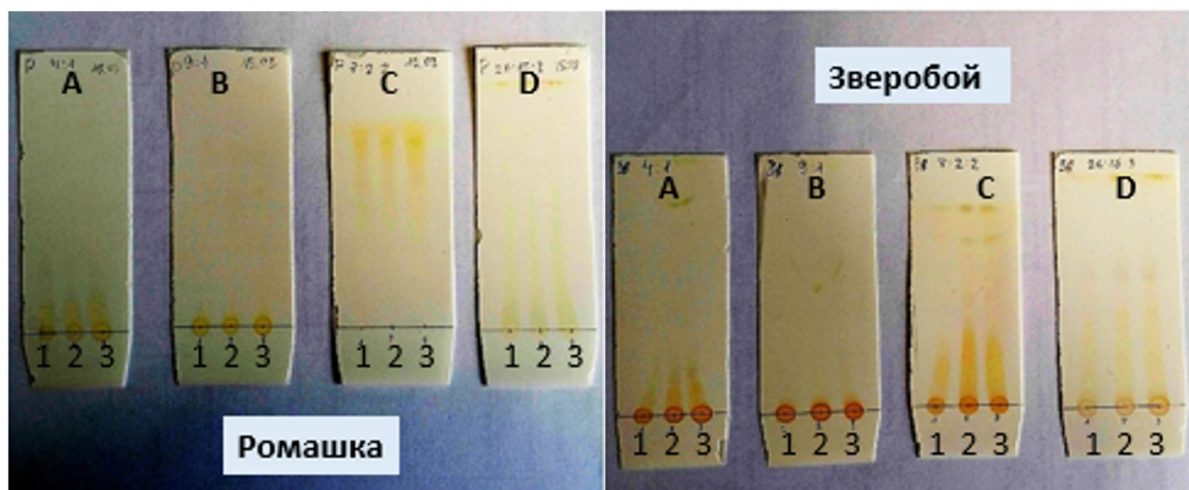


Рисунок 2 – ТСХ спиртовых растворов лекарственных растений: ромашка, зверобой по три пробы (1 – 20 мин, 2 – 40 мин, 3 – 60 мин) в четырёх элюентах: А, В, С, D без окрашивания

Наиболее оптимальная концентрация компонентов растворов наблюдается через 60 минут.

Как видно из рис. 2 наилучшее разделение экстрактов растений происходит в системе С состоящей из изопропанола, раствора аммиака и воды в соотношении 7:2:2.

Результат разделения методом тонкослойной хроматографии водных экстрактов ромашки и зверобоя по три пробы в зависимости от времени забора (20, 40, 60 мин) в различных элюентах представлен на рисунке 3.

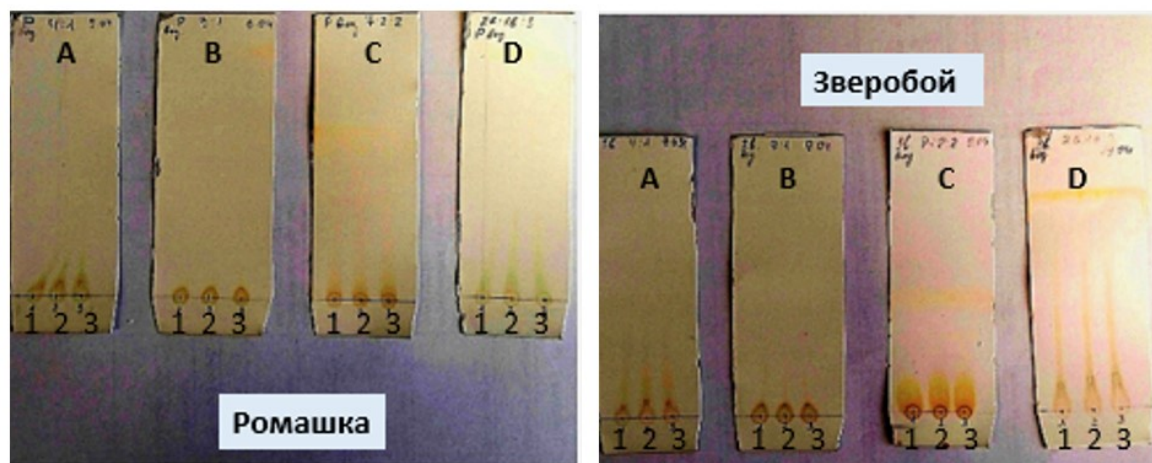


Рисунок 3 – ТСХ водных растворов лекарственных растений: ромашка, зверобой по три пробы (1 – 20, 2 – 40, 3 – 60 мин) в четырёх элюентах: А, В, С, D без окрашивания

Наиболее оптимальная концентрация компонентов раствора наблюдается через 60 минут.

Четкое разделение веществ происходит в элюирующей системе D – $\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (26:16:3). Следует отметить, что в водных экстрактах разделение соединений происходит лучше, чем в спиртовых экстрактах.

Вывод. Были получены водные и спиртовые экстракты ромашки и зверобоя, оптимальная концентрация их компонентов получена после 60 минут экстракции. С целью получения наилучшего разделения компонентов растворов были проанализированы четыре элюирующие системы: А – $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (4:1); В – $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$ (9:1); С – $\text{iso-PrOH} - \text{NH}_4\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (7:2:2); D – $\text{CHCl}_3 - 96\% \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (26:16:3);

В качестве элюентов оптимальными для тонкослойной хроматографии как водных, так и спиртовых экстрактов исследуемых растений оказались системы С – $\text{iso-PrOH} : \text{NH}_4\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (7:2:2) и D – $\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (26:16:3). Следует отметить, что разделение спиртовых растворов лучше проходит в системе С, а разделение водных растворов проходит лучше в системе D.

Список литературы

1. Леонова, М.В. Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое

пособие / М.В. Леонова, Ю.Н. Климочкин – Самара, Самар. гос. техн. ун-т. 2012. – 111 с.

2. Шаламова, Е.Л. Лекарственные растения в горном алтае: учебно-методический комплекс [Электронный ресурс]: ФГАУ ГНИИ ИТТ "Информика". – Режим доступа: <http://window.edu.ru>. – Дата доступа: 25.04.2021.

3. Павлова, Р.В. Экстракционно-хроматографическое определение физиологически-активных компонентов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» дис. канд. хим. наук: 02.00.02 / Р. В. Павлова; СГАУ им. акад. С.П. Королева. – Самара, 2015. – 24 с.

ЛОЗЮК Ю.Г., ТАРАСОВА Е.Е., ХАНЧЕВСКИЙ М.А.
**ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ВОДНОГО И СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТОВ
ЭВКАЛИПТА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

*Международный государственный институт имени А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Республика Беларусь,
г. Минск
e-mail: yulialozyuk16@gmail.com*

LOZYUK YU.G., TARASOVA E.E., KHANCHEVSKIY M. A.
**STUDY OF THE COMPOSITION OF WATER AND ALCOHOLIC
EXTRACTS OF EUCALYPTUS BY THIN-LAYER
CHROMATOGRAPHY**

*Belarusian State University, ISEI BSU, Republic of Belarus, Minsk
e-mail: yulialozyuk16@gmail.com*

Аннотация: изучены водный и спиртовой экстракты палочковидного эвкалипта методом тонкослойной хроматографии с целью выбора наилучшей системы для разделения веществ и выбора красителя для проявления компонентов экстрактов.

Abstract: the aqueous and alcoholic extract of rod-shaped eucalyptus were studied by thin layer chromatography with aim to select the best system for separation.

Ключевые слова: водный экстракт, спиртовой экстракт, эвкалипт, тонкослойная хроматография,

Keywords: Aqueous extract, alcoholic extract, eucalyptus, thin layer chromatography, eluent, system, staining, chromatogram.

Цель исследования: провести анализ водного и спиртового экстрактов палочковидного эвкалипта методом тонкослойной хроматографии, с целью выбора наилучшей системы для разделения растворов и для выбора красителя для проявления компонентов экстрактов.

Материалы и методы исследования. Водный и спиртовой экстракты эвкалипта, тонкослойная хроматография, экстракция.

Результаты исследования и их обсуждение. Эвкалипт обладает антибактериальной активностью, а также антисептическим и противовоспалительным действием. Его применяют в составе комплексной терапии воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, глотки и полости рта. В связи с этим, эвкалипт был выбран для исследования его компонентного состава. Водный и спиртовой экстракты эвкалипта готовили путем настаивания с последующим экстрагированием и концентрированием на ротационном испарителе (рис. 1).

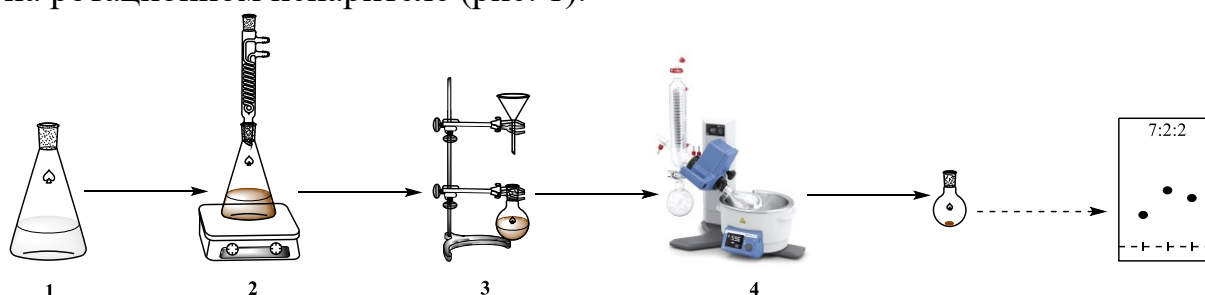


Рисунок 1 – Схема экстракции палочковидного эвкалипта 1 – настаивание в течение 30 минут, 2 – экстракция при 60° C в течение часа, 3 – фильтрация полученного экстракта, 4 – концентрирование на ротационном испарителе

Пробы отбирали через каждые 20 мин с целью выяснения оптимального времени экстракции. То есть по прошествии 20, 40 и 60 мин экстрагирования. Для разделения веществ использовали метод восходящей ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck).

В качестве подвижной фазы применялись следующие растворители:

- А. Хлороформ (CHCl₃) – метанол (MeOH) (4:1);
- В. Хлороформ (CHCl₃) – метанол (MeOH) (9:1);
- С. Изопропанол (iso-PrOH) – гидрат аммиака (NH₄OH) – вода (H₂O) (7:2:2);
- Д. Хлороформ (CHCl₃) – этанол (96% C₂H₅OH) – вода (H₂O) (26:16:3).

Результаты ТСХ спиртового и водного экстрактов эвкалипта, соответственно, в различных системах по три пробы в зависимости от времени забора (20, 40, 60 мин) представлены на рис. 2.

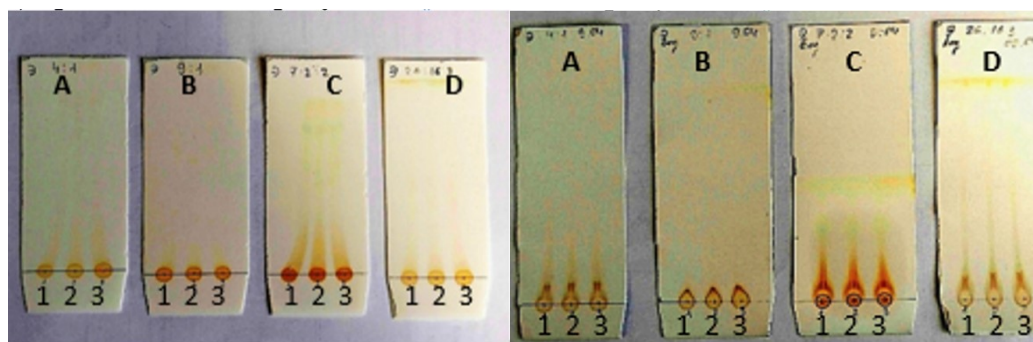


Рисунок 2 – ТСХ (слева) и водного (справа) растворов эвкалипта по три пробы (1 – 20 мин, 2 – 40 мин, 3 – 60 мин) в четырёх элюентах – А, В, С, D без окрашивания

Было установлено, что существенной разницы от времени забора проб нет. Видимость пятен на хроматограммах одинаковая.

Наилучшее разделение компонентов как спиртового, так и водного экстрактов эвкалипта происходит в системе С, состоящей из изопропанола, раствора аммиака и воды в соотношении 7:2:2.

Проведено окрашивание полученных хроматограмм в йодной камере, спиртовым раствором нингидрина (0,5 %), мастоин реагентом и 0,2 % спиртовым раствором нафторезорцина.

При окрашивании в йодной камере выявлено, что лучшее окрашивание пятен для обоих экстрактов наблюдается в системе С – iso-PrOH : NH₄OH : H₂O (7:2:2). Следует подчеркнуть, что проявление соединений на хроматограммах более четко выявлено спиртового экстракта эвкалипта, для водного экстракта не наблюдается четкого формирования пятен. Это свидетельствует о том, что в спиртовом экстракте эвкалипта преобладает содержание соединений, проявляемых в йодной камере, а это как правило вещества, содержащие свободные аминогруппы и серосодержащие соединения (рис. 3).

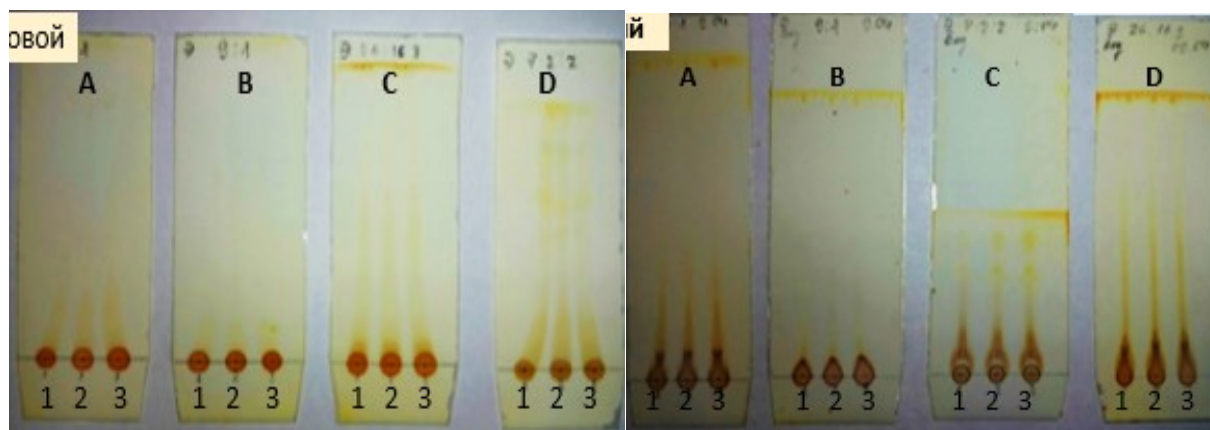


Рисунок 3 – Проявление пластинок с экстрактом эвкалипта: спиртовые (слева) и водные (справа) в йодной камере по три пробы (20, 40, 60 мин) в четырёх элюентах: А, В, С, D

При окрашивании 0,5 % спиртовым раствором нингидрина выявлено, что в системе С происходит окрашивание компонентов как спиртовых, так водных экстрактов эвкалипта. При этом, на хроматограммах спиртовых экстрактов эвкалипта окрашивание нингидрином слабое, четко выраженных фиолетовых пятен нет. Это говорит о том, что спиртовой экстракт эвкалипта не содержит α -аминокислот или их содержание минимально. В водном

экстракте окраска более интенсивная, что позволяет предположить содержание в водном экстракте большее количество α -аминокислот (рис. 4).

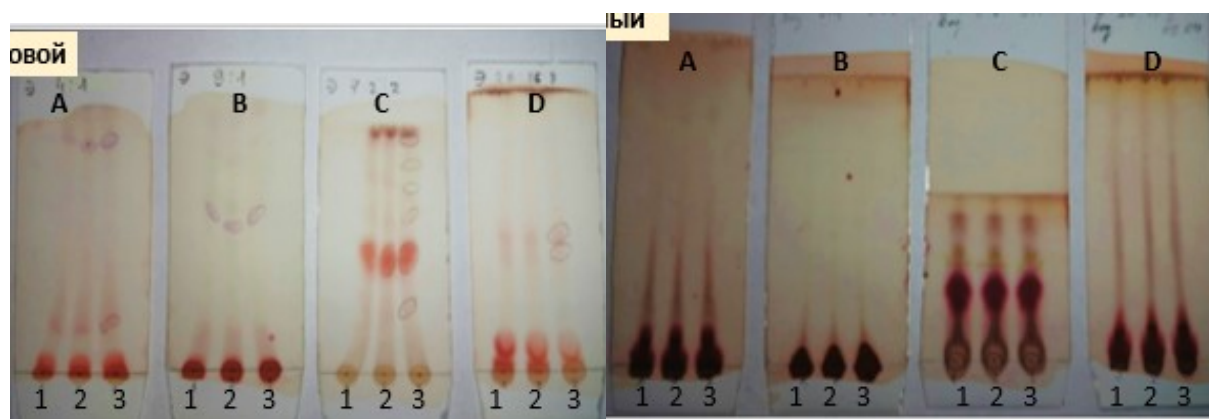


Рисунок 4 – Окраска пластинок нингидрином с экстрактам эвкалипта. Спиртовые (слева) и водные (справа), по три пробы (20, 40, 60 мин) в четырёх элюентах: А, В, С, D

При окрашивании мастоин реагентом видно, что лучшее проявление и разделение пятен спиртовых и водных экстрактов наблюдается также в системе С. На хроматограмме со спиртовой пробой разделение лучше, пятен больше, и они более выражены. Мастоин реагент окрашивает углеводные группировки. Это значит, что в спиртовом экстракте данных соединений больше. На хроматограмме с пробой водного экстракта пятна есть, но их меньше и интенсивность проявления ниже.

При окрашивании 0,2% спиртовым раствором нафторезорцина в присутствии серной кислоты выявлено, что лучшее проявление пятен спиртовых и водных экстрактов наблюдается в системе С: iso-PrOH : NH₄OH : H₂O (7:2:2). Нафторезорцин, как и мастоин реагент, является реагентом на наличие углеводов. Но данные реагенты проявляют разные углеводные группы. По проявляемым пятнам можем судить о наличии тех или иных углеводных группировок. При этом это может быть необязательно весь углеводный фрагмент, а часть молекулы, имеющая углеводную составляющую.

Окрашивание спиртового экстракта эвкалипта более интенсивное, чем водного, это свидетельствует о том, что спиртовые извлечения преобладают по содержанию углеводных группировок, проявляемых нафторезорцином.

Вывод. В результате изучения состава водного и спиртового экстракта эвкалипта установлено, что существенной разницы от времени забора проб нет. Разница в количественном составе водных и спиртовых экстрактов эвкалипта существует, однако, следует отметить, что существенной разницы разделения растворов не выявлено, но при окраске красителями экстракция спиртовым раствором для эвкалипта более существенна и зависит от применяемых красителей.

Список литературы

1. Леонова, М.В. Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие / М.В. Леонова, Ю.Н. Климочкин – Самара, Самар. гос. техн. ун-т. 2012. – 111 с.
2. Государственная Фармакопея СССР. – 11-ое изд. – Выпуск 2. – М.: Медицина, 1990 г. – 1600 с.
3. Павлова, Р.В. Экстракционно-хроматографическое определение физиологически-активных компонентов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного» дис. канд. хим. наук: 02.00.02 / Р. В. Павлова; СГАУ им. акад. С.П. Королева. – Самара, 2015. – 24 с.

¹МАЛЬЦЕВ М.Д., ¹МАЛЬЦЕВА Е.М., ^{1,2}ЕГОРОВА И.Н.
**ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЯ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ В ТРАВЕ И
КОРНЕВИЩАХ КИПРЕЯ УЗКОЛИСТНОГО (*EPILOBIUM
ANGUSTIFOLIUM* L.)**

¹Кемеровский государственный медицинский университет, г. Кемерово

²Лаборатория рекультивации и биомониторинга

Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, г Кемерово

E-mail: mikhail-malzev21@yandex.ru

¹MALTSEV M.D., ¹MALTSEVA E.M., ^{1,2}EGOROVA I. N.
**STUDY OF PROANTOCYANIDINE PROFILE IN THE GRASS AND
ROOTS OF ROSEBAY WILLOWHERB (*EPILOBIUM
ANGUSTIFOLIUM* L.)**

¹Reclamation and biomonitoring laboratories

Institute of Human Ecology, FIC UUH SB RAS, Kemerovo

²Kemerovo State Medical University, Kemerovo

E-mail: mikhail-malzev21@yandex.ru

Аннотация: в работе методом ТСХ с последующей денситометрией определён состав флаван-3-олов и проантоцианидинов в 70% водно-ацетоновых извлечениях травы и корневищ кипрея узколистного (*Epilobium angustifolium* L.). В извлечениях из травы обнаружены следы высокополимерных форм проантоцианидинов. Исследуемый образец извлечения из корневища кипрея узколистного содержит 4,7±0,15 % катехина, 46,3±0,49 % олигомерных форм и 49,0±0,82% тетра-, пента- и полимерные проантоцианидинов. Об обнаружении в корневищах кипрея узколистного олигомерных проантоцианидинов сообщено впервые.

Abstract: In the work by TLC followed by densitometry, the composition of flavan-3-ols and proanthocyanidins in 70% water-acetone extracts of grass and rhizomes of rosebay willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) was determined. Traces of high-polymer forms of proanthocyanidins were found in extracts from the herb. The studied sample of the extract from the rhizome of narrow-leaved fireweed contains $4.7 \pm 0.15\%$ catechin, $46.3 \pm 0.49\%$ oligomeric forms and $49.0 \pm 0.82\%$ tetra-, penta- and polymeric proanthocyanidins. The detection of oligomeric proanthocyanidins in rhizomes of fireweed narrow-leaved oligomeric proanthocyanidins was reported for the first time

Ключевые слова: кипрей узколистный, *Epilobium angustifolium* L, олигомерные проантоцианидины, флаван-3-олы, тонкослойная хроматография с денситометрией.

Keywords: rosebay willowherb, *Epilobium angustifolium* L, oligomeric proanthocyanidins, flavan-3-ols, thin-layer chromatography with densitometry.

Актуальность. Кипрей узколистный (*Epilobium angustifolium* L.) представитель семейства кипрейные (Onagraceae) – многолетнее широко распространённое лекарственное растение, является перспективным источником ценных биологически активных соединений (БАС), в частности полифенольных – флавоноидов, фенольных кислот и дубильных веществ гидролизуемого типа. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* для извлечений из цветков, листьев и травы кипрея узколистного, исследователями было установлено наличие антимикробной, противовоспалительной, обезболивающей, ранозаживляющей, антипролиферативной и антиоксидантной активности [1,2,3].

В качестве фиточая широко используются ферментированные листья кипрея узколистного, молодые побеги добавляют в салаты, из очищенных корневищ готовят супы или после высушивания добавляют в муку [4]. Данных по составу БАС в корневищах кипрея узколистного в доступной литературе нам найти не удалось.

Целью работы являлось изучение качественного и количественного состава флаван-3-олов и проантоцианидинов (ПАЦ) в траве и корневищах кипрея узколистного (*Epilobium angustifolium* L.) с помощью метода тонкослойной хроматографии с денситометрией.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись трава и корневища кипрея узколистного, заготовленные во время начала цветения на опытном участке Кузбасского ботанического сада ФИЦ УУХ СО РАН летом 2021 года. Собранное сырье сушили воздушно-теневым способом и хранили в бумажных пакетах. Измельчали сырье непосредственно перед исследованием.

Выделение полифенольного комплекса осуществляли методом мацерации измельченного растительного сырья с помощью 70% ацетона (1:10) в течение 5 дней в темном месте.

Сравнительное определение ПАЦ и флаван-3-олов в сырье проводили методом ТСХ на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А». Использовали денситометр с осветительной камерой Сорбфил КС 4.00.000 в условиях освещения лампами DULUX 7W/21 840 OSRAM (белого света) с системой фотофиксации Sony (Handycam HDR-CX405) и ТВ тюнером EasyCap (ООО «ИМИД», Россия). Обработку изображения осуществляли с применением ПО Sorbfil TLC View.

На пластинку наносили по 50 мкл полученных извлечений и 2 мкл 0,01% водно-ацетонового раствора эпигаллокатехингаллата (ЭГКГ, Sigma-Aldrich). Хроматографическое разделение проводили в системе растворителей: толуол – ацетон – муравьиная кислота (3:6:1 об/об). Проявление хроматограмм осуществлялась смесью 1% раствора ванилина и 9М раствором серной кислоты в этаноле, приготовленной *in situ*. После обработки пластины нагревали при температуре 100° С в течение 10–15 минут.

Эксперименты проводили в трёхкратной повторности. Содержание флаван-3-олов и ПАЦ определяли методом внутренней нормализации. Статистическую обработку результатов измерения проводили согласно требованиям ОФС.1.1.0013.15 с применением стандартной программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. В результате проведённых исследований на хроматограмме с образцом извлечения из травы кипрея узколистного наблюдали только следы полимерных ПАЦ на линии старта. Зона адсорбции СОВС ЭГКГ (R_f 0,83) отсутствовала у всех исследуемых образцов (рис.1).

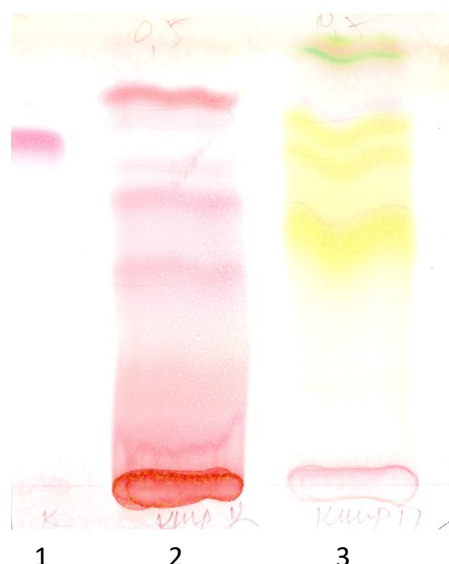


Рисунок 1 – Хроматограмма образцов 70% водно-ацетоновых извлечений корневища (2) и травы (3) кипрея узколистного на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А». ПФ: толуол – ацетон – муравьиная кислота (3:6:1 об/об). СОВС – 2 мкл 0,01% раствора эпигаллокатехингаллата (1).

Согласно литературным данным [5], зоны адсорбции над ЭГКГ принадлежат флаван-3-олам (мономерным единицам ПАЦ). На хроматограмме извлечения из корневищ кипрея узколистного наблюдается зона адсорбции катехина (R_f 0,91) и следы эпикатехингаллата (R_f 0,88).

Результаты количественного содержания флаван-3-олов и ПАЦ, проведенное денситометрическим методом внутренней нормализации, представлены на рисунке 2. В ходе исследования было установлено, что содержание мономерных флаван-3-олов в исследуемом образце извлечения из корневищ кипрея составило $4,7 \pm 0,15$ %.

На данной хроматограмме под зоной СОВС ЭГКГ так же наблюдаются зоны адсорбции димеров ПАЦ в диапазоне R_f от 0,40 до 0,76. Расчеты показали, что общее содержание димерных форм в образце составило $46,3 \pm 0,49$ %, а на долю три-, тетра- и пентамерных и более форм ОПАЦ (R_f от 0,2 до 0,4) приходится $49,0 \pm 0,82$ %.

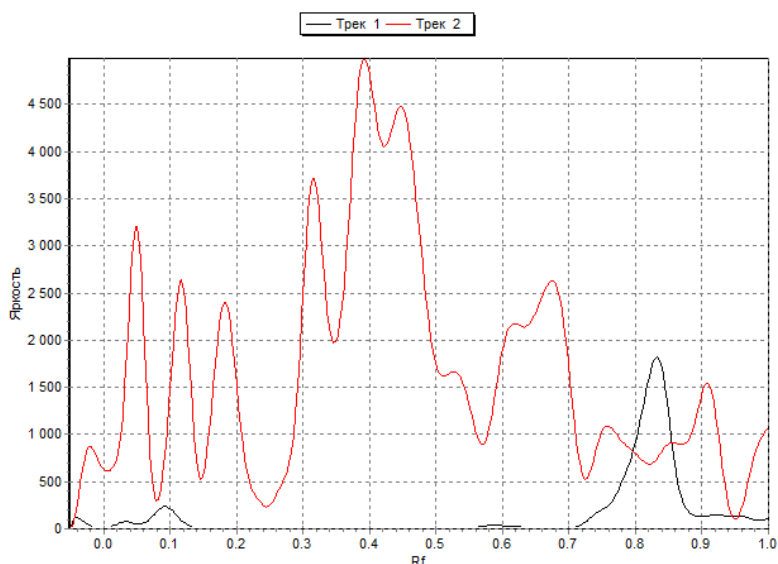


Рисунок 2 – Денситограмма хроматографического разделения 50 мкл 70% водно-ацетонового извлечения корневищ с корнями *Epilobium angustifolium* L (красная линия) на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». ПФ: толуол – ацетон – муравьиная кислота (3:6:1об/об). СОВС – 2 мкл 0,01% раствора эпигаллокатехингаллата (черная линия).

Выводы. Корневища *Epilobium angustifolium* L. - богатый источник флаван-3-олов и олигомерных проантоцианидинов. Основными фракциями являются олигомерные формы ПАЦ с общим содержанием $46,3 \pm 0,49$ % и полимерные формы – $49,0 \pm 0,82$ %. Сведения о наличии различных групп ПАЦ в корневищах кипрея узколистного получены нами впервые.

Список литературы

1. Granica S, Piwowski JP, Czerwińska ME, Kiss AK. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium*

species (Onagraceae): a review // J Ethnopharmacol. – 2014. – Vol. 28, № 156 P.316-346. doi: 10.1016/j.jep.2014.08.036.

2. Vitalone A, Allkanjari O. *Epilobium* spp: Pharmacology and Phytochemistry // Phytother Res. – 2018. – Vol.32, №7. – P. 1229-1240. doi: 10.1002/ptr.6072.

3. Dreger M., Adamczak A., Seidler-Łożykowska K., Wielgus K. Pharmacological properties of fireweed (*Epilobium angustifolium* L.) and bioavailability of ellagitannins. A review // Herba Polonica. – 2020. – Vol.66, № 1. – P..52-64. <https://doi.org/10.2478/hepo-2020-0001>

4. Kalle R., Belichenko O., Kuznetsova N., Kolosova V., Prakofjewa J., Stryamets N. et al. Gaining momentum: Popularization of *Epilobium angustifolium* as food and recreational tea on the Eastern edge of Europe // Appetite. – 2020. – Vol. 150. – P.104638. doi.org/10.1016/j.appet.2020.104638.

5. Bensa M, Glavnik V, Vovk I. Flavan-3-ols and Proanthocyanidins in Japanese, Bohemian and Giant Knotweed // Plants (Basel). – 2021. – Vol.10, № 2. – P.402. [doi:10.3390/plants10020402](https://doi.org/10.3390/plants10020402)