ISSN 0002-3590(print.)

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК. 2017. № 2

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ ХИМИЧЕСКИХ НАУК. 2017. № 2

Журнал основан в январе 1965 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 390 от 18.05.2009 г.

*Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь
для опубликования результатов диссертационных исследований,
включен в базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)*

Главный редактор

Сергей Александрович Усанов - академик-секретарь Отделения химии и наук о Земле Национальной академии наук Беларуси

Редакционная коллегия

А. В. Бильдюкевич – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси (*заместитель главного редактора*)
Н. П. Крутько – государственное научно-производственное объединение «Химические продукты и технологии» (*заместитель главного редактора*)
Я. В. Рощина – (*ведущий редактор*)
В. Е. Агабеков – Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси
А. А. Гилеп – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси
О. Б. Дормешкин – Белорусский государственный технологический университет
Е. Н. Калиниченко – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси
А. К. Карабанов – Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси

В. Д. Кошевар – Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси
М. И. Кузьменков – Белорусский государственный технологический университет
А. И. Кулак – Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси
Ф. А. Лахвич – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси
В. Г. Левашкевич – Отделение химии и наук о Земле Национальной академии наук Беларуси
И. И. Лиштван – Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси
В. И. Поткин – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси
Д. В. Свиридов – Белорусский государственный университет
В. А. Хрипач – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси
О. И. Шадыро – Белорусский государственный университет
В. В. Шманай – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси

Редакционный совет

В. Балтрунас – Центр исследований природы Литвы Института геологии и географии (*Литовская Республика*)
П. Драшар – Пражский университет химии и технологии (*Чешская Республика*)
Л. Маркс – Варшавский университет (*Республика Польша*)
В. Я. Прушак – Солигорский институт проблем ресурсосбережения с опытным производством (*Республика Беларусь*)
А. В. Рогачев – Научно-исследовательский институт физикохимии и технологии микро- и наноразмерных систем учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины» (*Республика Беларусь*)
Чжао Лян – Хэнаньская академия наук (*Китайская Народная Республика*)

Адрес редакции:
ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 284-19-19; e-mail: himvesti@mail.ru
Сайт журнала: vestichem.belnauka.by

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.
Серия химических наук. 2017. № 2.
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *Я. В. Рощина*
Компьютерная вёрстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 15.05.2017. Выход в свет 26.05.2017. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 74 экз. Заказ 69.
Цена: индивидуальная подписка – 10,34 руб., ведомственная подписка – 25,29 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук, 2017

ISSN 0002-3590(print.)

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

CHEMICAL SERIES, 2017, no. 2

The Journal was founded in January 1965

Periodicity is 4 issues per annum

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The Journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus in the State Registry of Mass Media, reg. no. 390

The Journal is included in the List of Journals for Publication of the results of Dissertation Research in the Republic of Belarus and in the database of Russian Scientific Citation Index (RSCI)

E d i t o r-i n-C h i e f

Sergei Aleksandrovich Usanov – Academician-secretary of the Department of Chemistry and Earth Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus

E d i t o r i a l B o a r d

A. V. Bildyukevich – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (*Associate Editor-in-Chief*)
N. P. Krutsko – State Research and Production Association «Chemical Products and Technologies» (*Associate Editor-in-Chief*)
Ya. V. Roshchina – (*Lead Editor*),
V. E. Agabekov – Institute of New Materials Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus
A. A. Gilep – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus
O. B. Dormeshkin – Belarusian State University of Technology
E. N. Kalinichenko – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus
A. K. Karabanov – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus
V. D. Koshevar – Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus
M. I. Kuzmenkov – Belarusian State University of Technology
A. I. Kulak – Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus
F. A. Lakhvich – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus
V. G. Levashkevich – Department of Chemistry and Earth Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus
I. I. Lishtvan – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus
V. I. Potkin – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus

D. V. Sviridov – Belarusian State University
V. A. Khripach – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus
O. I. Shadyro – Belarusian State University
V. V. Shmanai – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus

E d i t o r i a l C o u n c i l

V. Baltrunas – Lithuanian Nature Research Center of the Institute of Geology and Geography (*Republic of Lithuania*)
P. Drasar – Prague University of Chemistry and Technology (*Czech Republic*)
L. Marks – University of Warsaw (*Republic of Poland*)
V. Ya. Prushak – Soligorsk Institute of Resource Saving Problems with the Pilot Plant (*Republic of Belarus*)
A. V. Rogachev – Institute of Physical chemistry and Technology of Micro- and Nanoscale Systems at the Educational Institution «Francisk Skorina Gomel State University» (*Republic of Belarus*)
Zhao Liang – Henan Academy of Sciences (*People's Republic of China*)

Address of the Editorial Office:
Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Tel.: + 375 17 284-19-19; e-mail: himvesti@mail.ru
vestchem.belnauka.by

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.
Chemical series, 2017, no. 2.
Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *Ya. V. Roshchina*
Computer imposition *Y. A. Aheichyk*

It is sent of the press 15.05.2017. Appearance 26.05.2017. Format $60\times84^{1}/_{8}$. Offset paper.
The press digital. Printed pages 14,88. Publisher`s signatures 16,4. Circulation 74 copies. Order 69.
Price: individual subscription – 10,34 byn., departmental subscription – 25,29 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka".
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer, distributor of printing editions no. 1/18 dated August 2, 2013. License for the press no. 02330/455 dated December 30, 2013.
Address: F. Scorina Str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series, 2017

ISSN 0002-3590(print.)

ЗМЕСТ

ФІЗІЧНАЯ ХІМІЯ

Шахно Д. В., Солдатов В. С. Карбоксильный ионит на основе полиакрилонитрильного волокна как потенциальный компонент питательных субстратов для растений 7

Паньков В. В., Шутова Т. Г., Ливонович К. С., Котиков Д. А., Петрова Е. Г., Натаров В. О., Труханов С. В. Синтез и функционализация поверхности магнитных наночастиц $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ 15

КАЛОІДНАЯ ХІМІЯ

Кажуро И. П., Кошевар В. Д., Симаш Н. А. Гранулометрический состав и седиментационная устойчивость смешанных водно-дисперсионных систем полисилоксан–минеральный порошок 25

Опанасенко О. Н., Крутько Н. П., Жигалова О. Л., Лукша О. В., Козинец Т. А. Межфазные взаимодействия на границе раздела нефть–вода в присутствии анионных поверхностно-активных веществ 34

Комаров В. С., Бесараб С. В. Структурные параметры силикагеля в зависимости от температуры его синтеза 39

АНАЛІТЫЧНАЯ ХІМІЯ

Рахманько Е. М., Матвейчук Ю. В., Копырин А. Д., Потапкин Н. В. Молибдат-селективный электрод на основе высших четвертичных аммониевых солей 44

Заяц М. Ф. Разработка и валидация методики совместного определения остаточных количеств пестицидов в зерне озимой пшеницы методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием 51

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Козлов Н. Г., Басалаева Л. И., Атажанова Г. А., Адекенов С. М. Синтез амидопроизводных пулегона ... 61

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Гилевич С. Н., Бречко Ю. В., Рипинская К. Ю. Получение высокоактивной глутатион-S-трансферазы P1-1 из эритроцитов человека с помощью аффинных мембран и свойства очищенного фермента..... 66

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

Левицкий И. А., Баранцева С. Е., Позняк А. И. Совершенствование качества майоликовой посуды путем создания гармоничной системы керамическая матрица–глазурное покрытие 80

Амельченко В. Е., Болтовский В. С., Флейшер В. Л. Влияние условий экстракции на эффективность извлечения экстрактивных веществ из ромашки аптечной и мяты перечной..... 88

АГЛЯДЫ

Дормешкин Д. О., Бричко Е. А., Гилеп А. А., Усанов С. А. Фаговый дисплей в конструировании антител с заданными свойствами 93

Bei M. P., Yuvchenko A. P., Sokol O. V. Synthesis and properties of new derivatives of maleopimaric and citraconopimaric acids..... 111

ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ

Владимир Сергеевич Солдатов (К 80-летию со дня рождения) 126

ISSN 0002-3590(print.)

CONTENTS

PHYSICAL CHEMISTRY

Shakhno D. V., Soldatov V. S. A carboxylate ion exchanger based on polyacrylonitrile fiber as a potential component of nutrient substrates for plants 7

Pankov V. V., Shutava T. G., Livanovich K. S., Kotsikau D. A., Petrova E. G., Natarov V. O., Trukhanov S. V. $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ nanoparticles: synthesis, magnetic properties, surface functionalization 15

COLLOIDAL CHEMISTRY

Kazhuro I. P., Koshevar V. D., Simash N. A. Granulometric composition and sedimentation stability of water dispersion polysiloxane-mineral powder systems 25

Opanasenko O. N., Krutko N. P., Zhigalova O. L., Luksha O. V., Kozinets T. A. Interphase interactions on the oil-water interface in the presence of anionic surfactants 34

Komarov V. S., Besarab S. V. The relationship between synthesis temperature of silica gel and its structural parameters 39

ANALYTICAL CHEMISTRY

Rakhman'ko E. M., Matveichuk Yu. V., Kopyrin A. D., Potapkin N. V. Molybdate selective electrode based on higher quaternary ammonium salts 44

Zayats M. F. Development and validation of the method for co-determination of pesticide residues in winter wheat grain by gas chromatography with mass spectrometric detection 51

ORGANIC CHEMISTRY

Kozlov N. G., Basalaeva L. I., Atazhanova G. A., Adekenov S. M. Synthesis of pulegone amido derivatives 61

BIOORGANIC CHEMISTRY

Gilevich S. N., Brechka Yu. V., Ripinskaya K. Yu. Preparation of highly active human erythrocyte glutathione S-transferase P1-1 using affinity membranes, and properties of the purified enzyme 66

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING

Levitskii I. A., Barantseva S. E., Poznyak A. I. Improving the quality of majolica dishes by creating a ceramic matrix – glazed coating harmonious system 80

Amelchenko V. E., Boltovski V. S., Fleisher V. L. The effect of extraction conditions on the efficiency of extractives' recovery from *Matricaria chamomilla* and *Mentha × piperita* 88

REVIEWS

Dormeshkin D. O., Brichko E. A., Gilep A. A., Usanov S. A. Phage display in engineering of antibodies with desired properties 93

Bei M. P., Yuvchenko A. P., Sokol O. V. Synthesis and properties of new derivatives of maleopimaric and citraconopimaric acids 111

SCIENTISTS OF BELARUS

Soldatov, Vladimir Sergeevich (On the occasion of the 80th birthday) 126

ISSN 0002-3590(print.)

ФІЗІЧНАЯ ХІМІЯ

PHYSICAL CHEMISTRY

УДК 541.183

Поступила в редакцию 09.11.2016
Received 09.11.2016

Д. В. Шахно, В. С. Солдатов

Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

КАРБОКСИЛЬНЫЙ ИОНИТ НА ОСНОВЕ ПОЛИАКРИЛОНИТРИЛЬНОГО ВОЛОКНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ КОМПОНЕНТ ПИТАТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЙ

Определены параметры кислотности и тип функциональных групп аминокарбоксильного полиамфолита с преимущественным содержанием карбоксильных групп, полученного на основе промышленного полиакрилонитрильного волокна (Панион-110). Предложен алгоритм определения типа функциональных групп из кривых титрования при разных концентрациях фонового электролита. На основании теоретической модели рассчитаны кривые титрования при концентрациях фонового электролита, соответствующих почвенным и питательным растворам для растений. Сделан вывод о пригодности данного ионита в качестве компонента волокнистого ионообменного субстрата для растений – носителя иона калия.

Ключевые слова: ионный обмен, волокнистый ионит, потенциометрическое титрование, моделирование ионного обмена.

D. V. Shakhno, V. S. Soldatov

Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

A CARBOXYLATE ION EXCHANGER BASED ON POLYACRYLONITRILE FIBER AS A POTENTIAL COMPONENT OF NUTRIENT SUBSTRATES FOR PLANTS

The acidity parameters and type of functional groups of the aminocarboxylate polyampholyte with prevailing carboxylate groups prepared from an industrial polyacrylonitrile fiber (Panion-110), have been determined. An algorithm for determining the type of functional groups based on the potentiometric titration data at different concentrations of the background electrolyte, has been proposed. Titration curves were calculated for the background electrolyte concentrations corresponding to soil and nutrient solutions for plants. It has been concluded that the ion exchanger is suitable as a component of the ion exchanging fibrous substrate for plants, carrying potassium ions.

Keywords: ion exchange, fibrous ion exchanger, potentiometric titration, ion exchange simulation.

Волокнистые ионообменные материалы нашли широкое применение в качестве фильтров для отчистки воды и воздуха [1, 2]. Синтез и свойства их различных вариантов описаны в литературе [3–5]. Они производятся в Российской Федерации и Республике Беларусь под названиями Вион-КН-1, Фибан К-5 и Панион-110.

Ионнообменные материалы давно используются в качестве носителей отдельных питательных элементов [6] или среды для выращивания растений [7–9]. Однако волокнистые иониты пока не нашли применения в данной области. В нашей лаборатории установлена возможность использования этих ионитов в качестве волокнистого катионообменного компонента питательных сред для выращивания растений [10]. Такие субстраты предназначены для использования в условиях невесомости или переменной ориентации модулей для выращивания растений [11]. Однако имеющихся в литературе данных о кислотно-основных свойствах этих ионитов недостаточно для разработки научно обоснованного способа получения таких субстратов. В частности, не известна количественная взаимосвязь между содержанием в ионите биогенных ионов от их кон-

© Шахно Д. В., Солдатов В. С., 2017

центрации в питательном растворе и pH равновесного раствора. Для дальнейшего использования волокнистых ионитов в качестве субстрата для растений необходимы такие данные в интервале суммарной концентрации 10^{-5}–10^{-2} экв/л и pH в интервале 4,5–8. Такие составы являются типичными для питательных и почвенных растворов.

В данной работе приводятся экспериментальные данные о зависимости содержания в ионите ионов K^+ от pH и концентрации KNO_3 в растворах, равновесных с ионитом. На примере данного ионита описывается метод получения зависимостей $f(x,C)$ = pH в математическом виде, позволяющий сделать расчет состава раствора и ионита из параметров кислотности, определенных из данных потенциометрического титрования ионитов при высоких концентрациях солевого фона. Этот метод основывается на теоретической концепции, описанной в работе [12]. Ионит Панион-110 выбран в качестве объекта исследования в связи с его доступностью и относительно невысокой стоимостью.

Экспериментальная часть. Ионит Панион-110 производства ООО «ИМТ-Фильтр» (РБ) содержит карбоксильные и слабоосновные группы различного состава. Его полная катионо- и анионообменная емкость составляет 5,2 и 0,9 мэкв/г соответственно. Набухание ионита в H^+-OH^-- и K^+-формах равно 0,48 и 1,18 г/г. Ионит получен на основе ПАН волокна нитрон производства Новополоцкого ПО «Полимир». Его мономерный состав: акрилонитрил – 92,5%, метилакрилат – 6,0%, итаконовая кислота – 1,5% [13]. Ионит использовался в виде шпателя с 0,3 текс (эффективный диаметр филамента ~20μ).

Процесс получения ионита заключается в гидразидировании исходного волокна для придания ему сетчатой структуры с последующим гидролизом NaOH нитрильных групп до карбоксильных. Наличие анионообменных групп обусловлено гетероциклическими поперечными мостиками и продуктами побочных процессов взаимодействия гидразина с нитрильной группой, приводящими к образованию групп R-C(NH)-NH_2 и -C(O)-NH-NH_2. Таким образом, Панион-110 является полиамфолитом, преимущественно содержащим карбоксильные группы [2].

Кривые потенциометрического титрования получены методом одной навески в варианте, детально описанном в работе [14]. Титрованию подвергали образцы ионита, предварительно кондиционированные пятикратной обработкой растворами NaOH и HCl и отмытые дистиллированной водой до pH 6,2. Образцы не содержали Na^+- и Cl^--ионов. Титрование проводилось 1М раствором KOH или HNO_3. Титрант добавляли в суспензию ~0,5 г ионита в 30 мл раствора фонового электролита KNO_3. Титрант содержал KNO_3 в концентрации, равной концентрации фонового электролита. Кривые титрования снимались при концентрациях фонового электролита 0,05; 0,1; 0,315 и 1 моль/л. Его количество в каждой порции задавалось микропипеткой и уточнялось взвешиванием с точностью ±0,0002 г.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены кривые потенциометрического титрования ионита в H^+-OH^--форме в присутствии KNO_3 в различных концентрациях.

Обработку кривых титрования проводили в соответствии с теоретической моделью, разработанной в работе [12]. В рамках данной модели взаимодействие ионита в H^+-OH^- форме с кислотой и щелочью рассматривается как процесс анионного или катионного обмена, с последующей нейтрализацией H^+ или OH^- ионов.

$$R^-H^+ + Kt^+ \leftrightharpoons R^-Kt^+ + H^+ \quad (1)$$

$$R^+OH^- + An^- \leftrightharpoons R^+An^- + OH^- \quad (2)$$

$$OH^- + H^+ \leftrightharpoons H_2O \quad (3)$$

В нашем случае $Kt^+ = K^+$, $An^- = NO_3^-$. Уровнения (1) и (2) описываются с помощью коэффициента равновесия

$$k_{H^+}^{Kt^+} = \frac{x_{Kt}[H^+]}{(1-x_{Kt})[Kt^+]};\ k_{OH^-}^{An-} = \frac{x_{An}[OH^-]}{(1-x_{An})[An^-]}, \quad (4)$$

где x – эквивалентная доля иона титранта в ионите, величины в квадратных скобках – молярные концентрации.

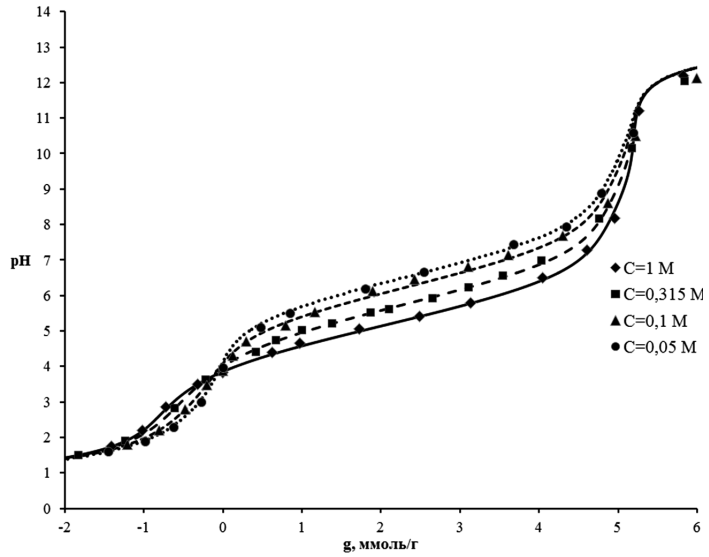


Рис. 1. Кривые титрования Панион-110 раствором KOH при различных концентрациях фонового электролита (KNO_3). Отрицательные значения *g* соответствуют титрованию кислотой. Точки – экспериментальные данные, линии рассчитаны с помощью модели [11] с параметрами, приведенными в таблице

Fig. 1. Panion-110 titration curves with KOH solution at different concentrations of the backgroiund electrolyte (KNO_3). Negative *g* values belong to titration with an acid. Dots are experimental data, curves are calculated according to [11] with parameters given in Table

В работе [12] показано, что ионный обмен, происходящий на слабоосновных анионообменных группах (5), которые существуют в виде свободных амминов, также описывается уравнениями (2), (4)

$$R + H^+ + An^- \leftrightharpoons RH^+An^-. \quad (5)$$

Коэффициенты равновесия – переменные величины. Зависимость их отрицательных логарифмов p*k* от *x* и C_{KtAn} аппроксимируется линейной зависимостью типа:

$$pk = pK^o + \Delta pk \cdot (x - 1/2) + b \cdot \lg C_{KtAn}, \quad (6)$$

где K^o – термодинамическая константа ионного обмена, при линейной аппроксимации: $K^o = k_{x=1/2}$; *b* – эмпирическая константа – для однозарядных ионов при ионном обмене на карбоксильном ионите близка к 0,2; C_{KtAn} – концентрация фонового электролита в растворе, Δp*k* – разность p*k* при полной и нулевой степени нейтрализации ионита. Константы pK^o, Δp*k* и *b* называются параметрами кислотности. Они не зависят от условий получения кривой титрования и составляют набор параметров, достаточных для расчета из них величин *x*, pH или C_{KtAn} при фиксированных других переменных.

Для ионита, содержащего несколько функциональных групп, необходимо иметь наборы параметров кислотности для функциональной группы каждого типа. Это относится к нашему случаю.

Для расчета теоретической кривой титрования H^+-OH^--формы ионита необходимо решить систему уравнений, составленную из логарифмических форм уравнений (4), (5) и уравнения массобаланса:

$$pH = \lg\left(\frac{x_{Kt}}{1 - x_{Kt}}\right) + \Delta pk_H^{Kt}\left(x_{kt} - 1/2\right) + pK^{o\,Kt}_H - (1 - b_{kt})\lg C_{KtAn}, \quad (7)$$

$$pH = -\lg\left(\frac{x_{An}}{1 - x_{An}}\right) - \Delta pk_{OH}^{An}\left(x_{An} - 1/2\right) + 14 - pK^{o\,An}_{OH} + (1 - b_{An})\lg C_{KtAn}, \quad (8)$$

$$V[\mathrm{H}^+] + m(g_{\mathrm{OH}} + S_{\mathrm{Kt}} - \sum_i E_{i\mathrm{Kt}} x_{i\mathrm{Kt}}) = V[\mathrm{OH}^-] + m(g_{\mathrm{H}} + S_{\mathrm{An}} - \sum_j E_{j\mathrm{An}} x_{j\mathrm{An}}), \quad (9)$$

где V – объем равновесного раствора, m – масса навески ионита, g_{H} и g_{OH} – количество эквивалентов добавленного титранта в расчете на грамм ионита, S_{Kt} и S_{An} – содержание катионов и анионов в исходном ионите (в случае H^+-OH^--формы S_{Kt} и $S_{\mathrm{An}} = 0$), E_{Kt} и E_{An} – емкости ионита по каждому типу катионо- и анионообменных групп.

При замене в (8) доли титранта x_{An} на долю OH^--формы x_{OH}=1- x_{An}

$$\mathrm{pH} = \lg(\frac{x_{\mathrm{OH}}}{1 - x_{\mathrm{OH}}}) + \Delta\mathrm{p}k_{\mathrm{OH}}^{\mathrm{An}}\left(x_{\mathrm{OH}} - 1/2\right) + 14 - \mathrm{p}K^{\mathrm{o}}{}_{\mathrm{OH}}^{\mathrm{An}} + (1 - b_{\mathrm{An}})\lg C_{\mathrm{KtAn}}, \quad (10)$$

полученные уравнения (7) и (10) отличаются только знаком перед lg$C$ и заменой $\mathrm{p}K^{\mathrm{o}}{}_{\mathrm{H}}^{\mathrm{Kt}}$ на $14 - \mathrm{p}K^{\mathrm{o}}{}_{\mathrm{OH}}^{\mathrm{An}}$.

Таким образом, взаимодействия протонизированных катионообменных групп в H^+-форме и протонизированных анионообменных с раствором фонового электролита описываются сходными уравнениями. Поэтому катионо- и анионообменные группы нельзя различить из данных потенциометрического титрования при одной концентрации фонового электролита. Однако разница между катионо- и анионообменными группами проявляется в зависимости pH от концентрации фонового электролита. Такая разница между катионо- и анионообменными группами заметна из хода кривых титрования (рис. 1). В области титрования анионообменных групп (g<0) при повышении концентрации фонового электролита pH увеличивается, а при титровании катионообменных групп (g>0) при повышении концентрации фонового электролита pH уменьшается. Однако только визуальный анализ кривых титрования не может дать сведения о параметрах кислотности и емкости каждого типа функциональных групп.

Для определения типа функциональной группы нами был предложен алгоритм, основанный на использовании только данных потенциометрических титрований при различных концентрациях фонового электролита.

1. Для упрощения описания ионного обмена при разных концентрациях фонового электролита все ионообменные группы обрабатываются как катионообменные.

2. Для каждой кривой потенциометрического титрования определяются $\Delta\mathrm{p}k_i$, E_i и вспомогательная величина $\mathrm{p}K_i^1$ для каждой функциональной группы.

Для катионообменных групп – $\mathrm{p}K^1 = \mathrm{p}K^{\mathrm{o}}{}_{\mathrm{H}}^{\mathrm{Kt}} - (1 - b_{\mathrm{Kt}})\lg C_{\mathrm{KtAn}}$.

Для анионообменных групп – $\mathrm{p}K^1 = 14 - \mathrm{p}K^{\mathrm{o}}{}_{\mathrm{OH}}^{\mathrm{An}} + (1 - b_{\mathrm{An}})\lg C_{\mathrm{KtAn}}$.

При такой замене определение вышеуказанных параметров сводится к определению параметров кислотности катионообменных групп при C_{KtAn} = 1 М. Алгоритм такого расчета описан в работе [13].

3. По известным параметрам $\mathrm{p}K_i^1$, $\Delta\mathrm{p}k_i$, E_i для каждой функциональной группы строятся дифференциальные кривые сорбции $dg/d\mathrm{pH}=f(\mathrm{pH})$, где g – количество сорбируемого катиона (ммоль/г), равное $E_i x_i$. Значения x_{i} находятся как численное решение уравнения (7) при известных pH, $\mathrm{p}K_i^1$, $\Delta\mathrm{p}k_i$, E_i. Значение производной $dg/d\mathrm{pH}$ рассчитывается численным методом по таблице значений x_i от pH.

Такие кривые позволяют найти диапазоны значений pH, для которых происходит сорбция на группах различного типа, а также диапазоны pH, при которых сорбция происходит совместно на нескольких ионообменных группах.

4. Для определения типа ионообменной группы необходимо проанализировать как будут смещаться дифферинциальные кривые сорбции для каждой группы с изменением концентрации. Максимум на таких кривых наблюдается при x_i = 0,5. Из уравнений (7) и (8):

для катионообменных групп – $\mathrm{pH}_{\max} = \mathrm{p}K^{\mathrm{o}}{}_{\mathrm{H}}^{\mathrm{Kt}} - (1 - b_{\mathrm{Kt}})\lg C_{\mathrm{Kt}}$;

для анионообменных групп – $\mathrm{pH}_{\max} = 14 - \mathrm{p}K^{\mathrm{o}}{}_{\mathrm{OH}}^{\mathrm{An}} + (1 - b_{\mathrm{An}})\lg C_{\mathrm{An}}$.

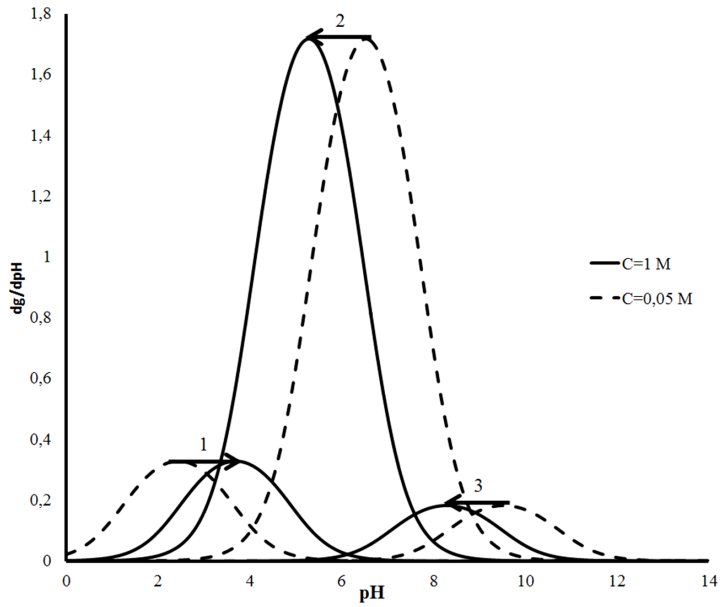


Рис. 2. Рассчитанные дифференциальные кривые сорбции ионита Панион-110. Цифрами обозначен тип функциональной группы; стрелками – направление сдвига максимума дифференциальных кривых сорбции при повышении концентрации фонового электролита

Fig. 2. Calculated differential sorption curves for Panion-110 ion exchanger. Numbers designate functional group types, arrows show the direction of shift for differential sorption curve maximums with background electrolyte concentration increase

Так как $b < 1$, максимумы на дифференциальных кривых сорбции катионообменных групп при повышении концентрации фонового электролита смещаются в сторону уменьшения pH, а для анионообменных групп – в сторону увеличения.

5. Из зависимости pK_i^1 от концентрации фонового электролита C_{KtAn} определяются параметры $pK_i°$ и b.

На рис. 2 приведены дифференциальные кривые сорбции на ионите Панион-110 для двух концентраций фонового электролита (C = 0,05 моль/л и C = 1,0 моль/л). Из рисунка видно, что максимум, соответствующий группе 1, при повышении концентрации фонового электролита смещается в сторону увеличения pH, а максимумы, соответствующие группам 2 и 3, в сторону его уменьшения. Следовательно, группа 1 является анионообменной, а группы 2 и 3 катионообменными.

Таким образом, кривые титрования можно описать тремя наборами параметров кислотности, приведенными в таблице.

Тип ионообменной группы и параметры кислотности ионита Панион-110

Types of anion exchanging groups and acidity parameters for Panion-110 anion exchanger

Номер группы	1	2	3
Тип группы	Анионообменная	Катионообменная	Катионообменная
E	0,9	4,7	0,5
p$K°$	10,3	5,3	8,3
Δpk	1,0	1,0	1,0
b	0,05	0,05	0,05

Из работы [15] известно, что в полиамфолитах аминокарбоксильного типа в протонизированной форме (область низких pH) в реакцию нейтрализации при потенциометрическом титровании первыми вступают слабоосновные протонизированные группы.

При титровании H^+-OH^--формы ионита кислотой происходит протонизация основных групп, в нашем случае групп типа 1:

$$R_3N + H^+ + NO_3^- \leftrightharpoons R_3NH^+NO_3^-. \quad (9)$$

Область более высоких pH относится к нейтрализации свободных карбоксильных групп, обозначенных в таблице как группы типа 2:

$$RCOOH + K^+ + OH^- \leftrightharpoons RCOOK + H_2O. \quad (11)$$

Дальнейшее добавление KOH к системе ионит–раствор приводит к медленному росту pH, соответствующему нейтрализации более слабых кислотных групп, в роли которых могут выступать карбоксильные группы, связанные с основными группами во внутримолекулярный комплекс, группы типа 3:

$$RCOOH{\cdot}NR_3 + K^+ + OH^- \leftrightharpoons RCOOK + R_3N + H_2O.$$

Поскольку значение параметра *b* оказалось равным 0,05, что значительно меньше, чем рекомендованное значение – 0,2, то можно предположить, что некоторые свойства ионитов, а именно коэффициент *b*, в значительной степени зависят от химической природы ионита. При совместном присутствии катионо- и анионообменных групп значения *b* могут принимать нехарактерные для карбоксильных ионитов значения близкие к 0.

При низких концентрациях фонового электролита пики, соответствующие группам типов 1 и 2, не пересекаются. В интересующей нас области pH 4,5–8,5 и концентраций (10^{-5}–10^{-2} моль·экв/л) преимущественно происходит процесс нейтрализации свободных карбоксильных групп с типичной для них p$K°$ = 5,3. Поэтому при использовании данного ионита в качестве катионообменной части субстрата для растений его ионообменные свойства можно описывать, используя только одну основную катионообменную группу (свободные карбоксильные группы, тип 2), так как в диапазоне pH и концентраций электролита, соответствующим реально используемым питательным растворам, титрованию подвергаются только свободные карбоксильные группы.

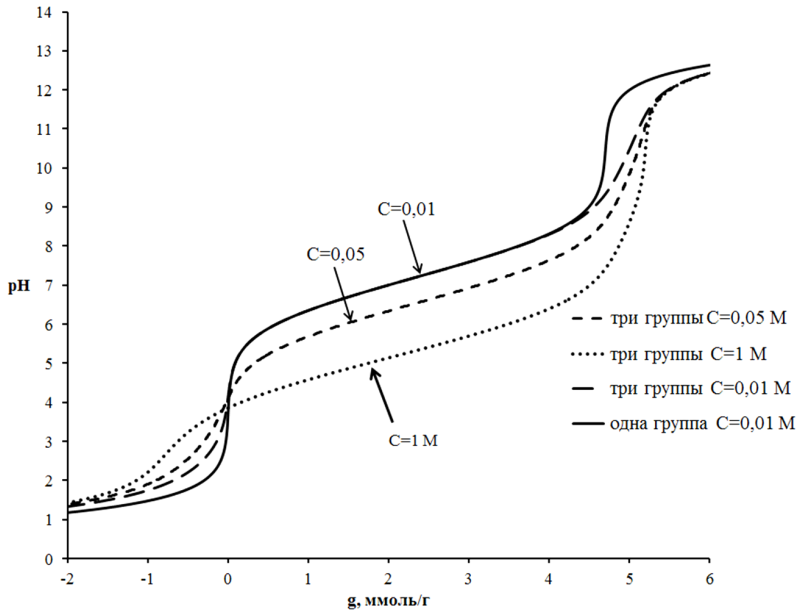


Рис. 3. Модельные кривые титрования ионита Панион-110, рассчитанные с помощью модели [11] с параметрами, приведенными в таблице. Для концентрации C_{KtAn} = 0,01 M приведены кривые титрования, рассчитанные с учетом всех трех типов функциональной группы и только с учетом группы типа 2

Fig. 3. Simulated titration curves for Panion-110 anion exchanger, calculated according to [11] with parameters given in Table. For C_{KtAn} = 0,01 M, titration curves are given both including all three functional group types and only including type 2 groups

Из полученных параметров кислотности была теоретически рассчитана кривая титрования, соответствующая раствору с концентрацией C = 0,01 моль/л (рис. 3), что соответствует типичной концентрации почвенных растворов.

Анализируя полученную модельную кривую титрования можно сделать вывод, что данный ионит можно применять в качестве компонента субстрата для растений при pH питательного раствора > 6, так как при более низком pH мала величина сорбции иона K^+. Данный диапазон pH подходит для большинства видов сельскохозяйственных и декоративных растений. Однако Панион-110, как и любой другой слабокислотный ионит, не будет подходить в качестве компонента субстрата для кислотолюбивых растений.

Выводы

1. Предложен простой способ определение типа ионнообменной группы в полиамфолите, исходя только из кривых потенциометрического титрования при разных концентрациях фонового электролита.

2. Определены параметры кислотности полиамфолита Панион-110, содержащего преимущественно карбоксильные группы. Данные параметры позволяют теоретически рассчитать кривые потенциометрического титрования при любой концентрации фонового раствора, даже при низких концентрациях, когда невозможно получить экспериментальные кривые титрования.

3. Спрогнозированы кривые потенциометрического титрования при концентрации фонового электролита, соответствующей питательному раствору (0,01 М). Показано, что при концентрации фонового раствора, соответствующей концентрации питательного раствора (10^{-5}–10^{-2} моль·экв/л) и физиологически приемлемого для растений pH (4,5–8), данную кривую титрования можно описать одной функциональной группой.

4. Панион 110 может стать эффективным компонентом субстрата для растений (носителя ионов калия) в диапазоне pH питательного раствора 6–8,5.

Список использованных источников

1. Soldatov, V. S. Ion exchangers for air purification / V. S. Soldatov, E. G. Kosandrovich // Ion exchange and solvent extraction. – 2011. – Vol. 20. – P. 45–117.

2. Kosandrovich, E. G. Fibrous Ion Exchangers / E. G. Kosandrovich, V. S. Soldatov // Ion exchange technology I: theory and materials. – Amsterdam: Springer, 2012. – P. 299–371.

3. Зверев, М. П. Хемосорбционные волокна / М. П. Зверев. – М.: Химия, 1981. – 191 с.

4. Вольф, Л. А. Волокна с особыми свойствами / Л. А. Вольф. – М.: Химия, 1980. – 240 с.

5. Soldatov, V. S. Synthesis, structure and properties of new fibrous ion exchangers / V. S. Soldatov, A. A. Shunkevich, G. I. Sergeev // React. Polymers. – 1988. – Vol. 7, № 2–3. – P. 159–172.

6. Arnon, D. I. Nutrient. Ion-exchange Materials / D. I. Arnon, K. A. Grossenbacher // Soil Sci. – 1947. – Vol. 63, № 3. – P. 159–182.

7. Chmoczynska, M. The influence of ion-exchange substrates on grass growth in sandy soils / M. Chmoczynska [et. al.] // J. Plant. Nutr. Soil. Sci. – 2014. – Vol. 117, № 3. – P. 438–442.

8. Солдатов В. С. Ионитные почвы / В. С. Солдатов, Н. Г. Перышкина, Р. П. Харошка. – Минск: Наука и техника, – 1978. – 272 с.

9. Matraszek, R. Productivity and chemical composition of tomato and cucumber plants growing in nickel polluted soils fertilized with Biona-312 / R. Matraszek [et al.] // Comm. soil sci. plant anal. – 2010. – Vol. 41, № 2. – P. 155–172.

10. Искусственные субстраты для растений на основе волокнистых ионообменных материалов / В. С. Солдатов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 1985. – № 6. – С. 85– 90.

11. Федюнькин, Д. В. Интенсивная культура растений в искуственных условиях / Д. В. Федюнькин. – Минск: Наука и техника, –1988. – 213 с.

12. Soldatov, V. S. Potentiometric titration of ion exchangers / V. S. Soldatov // React. Funct. Polym. – 1998. – Vol. 38, № 2–3. – С. 73–112.

13. Нестеренок, П. В. Метод определения параметров кислотности полиамфолитов / П. В. Нестеренок, В. С. Солдатов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2013. – № 2. – С. 31–36.

14. Миронова, Т. В. Потенциометрическое титрование ионитов при различных концентрациях фонового электролита / Т. В. Миронова, В. С. Солдатов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2003. – № 4. – С. 95–100.

15. Нестеренок, П. В. Протолитические свойства аминокарбоксильных полиамфолитов на основе модакриловой полимерной матрицы / П. В. Нестеренок, В. С. Солдатов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2014. – № 4. – С. 72–79.

References

1. Soldatov V. S., Kosandrovich E. G., “Ion exchangers for air purification”, *Ion exchange and solvent extraction*, 2011, vol. 20, pp. 45–117.

2. Kosandrovich E. G., Soldatov V. S., “Fibrous Ion Exchangers”, *Ion exchange technology I: theory and materials*, Springer, Amsterdam, NL, 2012, pp. 299–371.

3. Zverev M. P., *Khemosorbtsionnye volokna* [Chemosorption fibers], Khimiia, Moscow, RU, 1981.

4. Vol’f L. A., *Volokna s osobymi svoistvami* [Fibers with special properties], Khimiia, Moscow, RU, 1980.

5. Soldatov V. S., Shunkevich A. A., Sergeev G. I., “Synthesis, structure and properties of new fibrous ion exchangers”, *Reactive Polymers*, 1988, vol. 7, no. 2–3, pp. 159–172.

6. Arnon D. I., Grossenbacher K. A., “Nutrient. Ion-exchange Materials”, *Soil Science*, 1947, vol. 63, no. 3, pp. 159–182.

7. Chmoczynska M., Pristavko S., Soldatov V. S., Wasag H., “The influence of ion-exchange substrates on grass growth in sandy soils”, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2014, vol. 117, no. 3, pp. 438–442.

8. Soldatov V. S., Peryshkina N. G., Kharoshka R. P., *Ionitnye pochvy* [Ion-exchanging soils], Nauka i tekhnika, Minsk, BY, 1978.

9. Matraszek R., Szymańska M., Chomczyńska M., Soldatov V. S., “Productivity and chemical composition of tomato and cucumber plants growing in nickel polluted soils fertilized with Biona-312”, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2010, vol. 41, no. 2, pp. 155–172.

10. Soldatov V. S., Peryshkina N. G., Lukashevich L. I., Khoroshko R. P., “Artificial substrates for plants based on fibrous ion exchanging materials”, *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 1985, no. 6, pp. 85– 90.

11. Fediun’kin D. V., *Intensivnaia kul’tura rastenii v iskusstvennykh usloviiakh* [Intensive plant cultivation under artificial conditions], Nauka i tekhnika, Minsk, BY, 1988.

12. Soldatov V. S., “Potentiometric titration of ion exchangers”, *Reactive and Functional Polymers*, 1998, vol. 38, no. 2–3, pp. 73–112.

13. Nesterenok P. V., Soldatov V. S., “A method for determination of polyampholytes’ acidity parameters”, *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2013, no. 2, pp. 31–36.

14. Mironova T.V., Soldatov V.S., “Potentiometric titration of ion exchangers at various concentrations of background electrolyte”, *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2003, no. 4, pp. 95–100.

15. Nesterenok P. V., Soldatov V. S., “Protolytic properties of aminocarboxylic polyampholytes based on modacryl polymeric matrix”, *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2014, no. 4, pp. 72–79.

Информация об авторах

Шахно Дмитрий Викторович – мл. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shakhnodv@gmail.com.

Солдатов Владимир Сергеевич – академик, д-р хим. наук, профессор, зав. лаб., Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: soldatov@ifoch.bas-net.by.

Для цитирования

Шахно, Д. В. Карбоксильный ионит на основе полиакрилонитрильного волокна как потенциальный компонент питательных субстратов для растений / Д. В. Шахно, В. С. Солдатов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 7–14.

Informanion about the autors

Shakhno Dzmitry Viktorovich – Junior Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13 Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shakhnodv@gmail.com.

Soldatov Vladimir Sergeevich – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Laboratory, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus. (13 Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: soldatov@ifoch.bas-net.by.

For citation

Shakhno D. V., Soldatov V. S. A carboxylate ion exchanger based on polyacrylonitrile fiber as a potential component of nutrient substrates for plants. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 7–14. (In Russian).

ISSN 0002-3590(print.)
УДК 544.163'165:541.67:541.451:615.84:537.622:544.77

Поступила в редакцию 31.05.2016
Received 31.05.2016

В. В. Паньков[1], Т. Г. Шутова[2], К. С. Ливонович[2], Д. А. Котиков[1], Е. Г. Петрова[1], В. О. Натаров[1], С. В. Труханов[3]

[1] Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
[2]Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[3] Научно-практический центр НАН Беларуси по материаловедению, Минск, Республика Беларусь

СИНТЕЗ И ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$

Методом соосаждения с Na_2CO_3 из растворов солей получены наночастицы твердых растворов в системе $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ ($x \leq 0{,}3$). Для ряда составов ($Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$, $Mg_{0,05}Zn_{0,1}Fe_{2,85}O_4$, $Zn_{0,18}Fe_{2,82}O_4$) обнаружен рост намагниченности насыщения по сравнению с незамещенным магнетитом (M_S = 64 А·м^2·кг$^{-1}$), что объясняется склонностью ионов цинка и малых количеств ионов магния занимать в решетке магнетита преимущественно тетраэдрические пустоты. В случае совместного замещения цинком и магнием в системе $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ вплоть до x = 0,3 значения намагниченности насыщения незначительно снижаются относительно магнетита, однако остаются на постоянном уровне ($M_S \approx 58$ А·м^2·кг$^{-1}$), предположительно благодаря стабилизирующему влиянию ионов магния. Ультразвуковым диспергированием нанопорошков в водных растворах полиэлектролитов получали коллоидные растворы наночастиц в неагломерированном состоянии. Наилучшей седиментационной устойчивостью (45 дней) обладают наночастицы, модифицированных слоем положительно заряженного полиэлектролита. Их гидродинамический диаметр не превышает 200 нм, причем преобладает фракция частиц с размерами 40–80 нм.

Ключевые слова: наночастицы $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$, соосаждение, намагниченность насыщения, полиэлектролиты, адсорбция.

V. V. Pankov[1], T. G. Shutava[2], K. S. Livanovich[2], D. A. Kotsikau[1], E. G. Petrova[1], V. O. Natarov[1], S. V. Trukhanov[3]

[1] Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus
[2] Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[3] Scientific and Practical Materials Research Centre of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

$(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ NANOPARTICLES: SYNTHESIS, MAGNETIC PROPERTIES, SURFACE FUNCTIONALIZATION

The nanoparticles of $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ ($x \leq 0.3$) solid solutions have been prepared by coprecipitation with Na_2CO_3 from solutions of salts. For a number of compositions ($Mg_{0.1}Fe_{2.9}O_4$, $Mg_{0.05}Zn_{0.1}Fe_{2.85}O_4$, $Zn_{0.18}Fe_{2.82}O_4$), an increase of saturation magnetization has been detected, as compared to non-substituted magnetite (M_S = 64 emu/g). This can be explained by the tendency of zinc and small amounts of magnesium ions to occupy preferentially tetrahedral sites of the magnetite lattice. In the case of zinc and magnesium joint substitution in the $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ system up to x = 0.3, the values of saturation magnetization decrease slightly comparing to that of magnetite, but remain constant ($M_S \approx 58$ emu/g). By ultrasound assisted dispersion of nanopowders into polyelectrolyte aqueous solutions, colloidal solutions of non-agglomerated nanoparticles have been prepared. The nanoparticles modified with a layer of positively charged polyelectrolyte demonstrate the best sedimentation stability up to 45 days. Their hydrodynamic diameter is lower than 200 nm, with predominance of the fraction with the size of 40–80 nm.

Keywords: $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ nanoparticles, coprecipitation, saturation magnetization, polyelectrolytes, adsorption.

Введение. В последние годы становятся все более очевидными преимущества магнитных наночастиц (МНЧ) для биологических и медицинских приложений [1]. Это позволяет использовать их в таких целях, как адресная доставка лекарств, магнитная и радиочастотная локальная гипертермия опухолей, а также контрастирование изображений в магнитно-резонансной томографии (МРТ) [2–4]. Наиболее широко в этих целях используются наночастицы на основе ферримагнитных оксидов железа – магнетита (Fe_3O_4) и маггемита (γ-Fe_2O_3).

Магнитно-резонансная томография отличается от других современных методов медицинской диагностики прежде всего тем, что дает возможность многофакторного прижизненного неинва-

зивного изучения структур человеческого тела. Однако, несмотря на высокую точность изображений МРТ, в некоторых случаях необходимо повышать ее диагностическую чувствительность. Для этих целей используются специальные контрастные вещества, вводимые пациенту внутривенно. Благодаря своим уникальным физическим свойствам МНЧ в настоящее время активно исследуются в качестве нового поколения МРТ-контрастов [5, 6].

Одним из важнейших факторов, определяющих применимость МНЧ в медицине, является вопрос об их токсичности и биологической совместимости. Наиболее часто используемый метод снижения токсичности наночастиц – это нанесение на них покрытий, как правило, на основе органических полимеров, таких как полиэтиленгликоль или декстран [7, 8]. Слой гидрофильного полимера на поверхности частиц позволяет уменьшить их опсонизацию белками плазмы и выведение системой мононуклеарных фагоцитов (СМФ), а также обеспечить пролонгированное существование модифицированных наночастиц в кровотоке. Однако процессы инкапсуляции МНЧ могут приводить к образованию агрегатов частиц микронных размеров, способных инициировать тромбообразование и ускорить элиминирование МНЧ из кровотока. Поэтому важна разработка как эффективных методов синтеза, так и капсулирования МНЧ.

Другим методом снижения токсичности является подбор состава наночастиц с использованием низкотоксичных компонентов. Однако магнитные характеристики таких материалов часто уступают их более токсичным аналогам, в связи с чем остается открытым вопрос о нахождении путей управления магнитными свойствами МНЧ. Например, предложенные к использованию магний–цинковые ферриты $Mg_xZn_{1-x}Fe_2O_4$ со структурой шпинели [9–11], содержащие малотоксичные ионы магния и цинка [12], обладают меньшей намагниченностью по сравнению с Fe_3O_4 и γ-Fe_2O_3, что ограничивает эффективность их применения. Вместе с тем известно, что легирование Fe_3O_4 небольшим количеством ионов цинка или магния с образованием твердых растворов замещения $Zn_xFe_{3-x}O_4$, $Mg_xFe_{3-x}O_4$ ($x < 1$) приводит к увеличению намагниченности магнетита. В данном случае, наряду с частичным замещением относительно токсичных ионов Fe^{2+} на малотоксичные ионы Fe^{3+}, Mg^{2+}, и Zn^{2+}, имеет место и высокая намагниченность материала. Вместе с тем, в литературе нет сведений о закономерностях изменения структуры и свойств твердых растворов $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$.

Данная работа посвящена установлению влияния степени замещения ионов железа наноразмерного магнетита ионами цинка и магния с образованием твердых растворов $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ ($x \leq 0{,}3$) на их магнитные свойства, степень дисперсности и возможность модификации поверхности наночастиц органическими соединениями (полиэлектролитами, белками, поверхностно-активными веществами). Важными при этом являются вопросы создания химически- и седиментационно-устойчивых дисперсий малотоксичных и биосовместимых наночастиц $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$, стабилизированных полиэлектролитными оболочками, что открывает перспективы для создания на их основе препаратов, обеспечивающих эффективное повышение контрастности изображений при МРТ-исследованиях.

Методика эксперимента. *Синтез Mg, Zn-замещенного магнетита карбонатным соосаждением из раствора солей.* Образцы составов: Fe_3O_4, $Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$, $Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$, $Mg_{0,05}Zn_{0,1}Fe_{2,85}O_4$, $Mg_{0,12}Zn_{0,08}Fe_{2,8}O_4$, $Mg_{0,1}Zn_{0,1}Fe_{2,8}O_4$, $Mg_{0,1}Zn_{0,2}Fe_{2,7}O_4$, $Zn_{0,18}Fe_{2,82}O_4$, $Zn_{0,3}Fe_{2,7}O_4$ получали модифицированным золь-гель методом из растворов кристаллогидратов солей соответствующих металлов ($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, $Zn(NO_3)_2 \cdot 7H_2O$, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ и $FeSO_4 \cdot 7H_2O$). Исходные реагенты брали в стехиометрическом соотношении ($Fe^{3+} : Fe^{2+} : M_1^{2+} : M_2^{2+} = 2 : (1\text{-}x\text{-}y) : x : y$ моль). В качестве осадителя использовали концентрированный раствор карбоната натрия Na_2CO_3 со значением pH 11. Условия позволяли достичь полного депротонирования аквакомплексов ионов всех металлов без образования водорастворимых гидроксикомплексов. Растворы прекурсоров и осадителя сливали при комнатной температуре при интенсивном перемешивании, затем быстро нагревали до 90 ºС и прекращали нагрев. Полученный магнитный осадок отмывали от сопутствующих синтезу солей методом магнитной декантации. Чтобы убедиться в количественном протекании реакции, анализировали оставшийся после отделения магнитной фазы раствор на содержание ионов Zn^{2+} и Mg^{2+}.

Независимыми параметрами при оптимизации методики соосаждения с использованием карбоната натрия являлись: концентрация растворов прекурсора и осадителя; порядок и скорость смешивания реагентов; температура смешивания и выдерживания реакционной смеси; pH реакционной смеси; время синтеза; скорость перемешивания. Несмотря на большое число внешних факторов, которые влияют на структурно-фазовый состав и морфологию образуемого продукта, данный подход предоставляет широкие возможности по управлению синтезом наночастиц.

Структурные исследования материалов. Рентгенограммы порошкообразных образцов записывали на дифрактометре ДРОН-2.0 (Co Kα-излучение) в интервале 2Θ = 20–90°. Размеры областей когерентного рассеяния (ОКР) определяли по уширению дифракционных отражений.

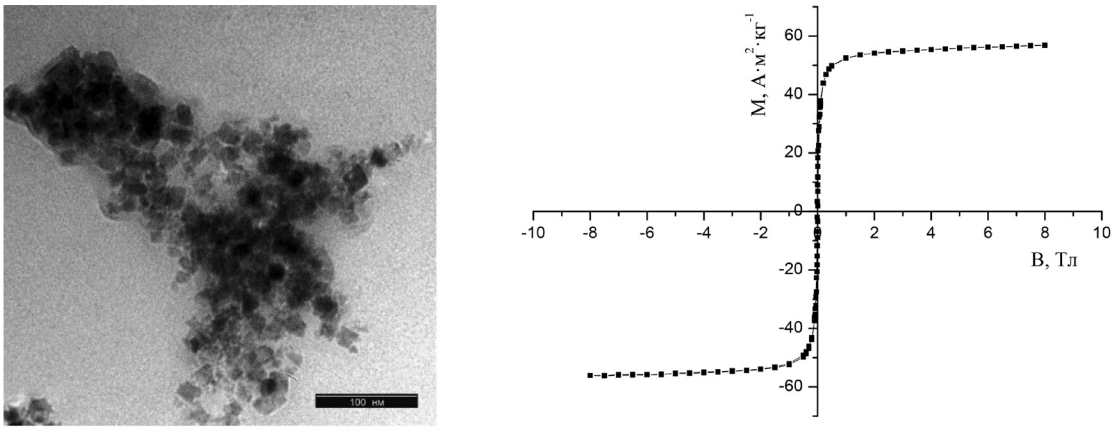
Размер и морфологию частиц изучали с помощью сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии с использованием микроскопов LEO 906E, JOEL EM100 CX и LEO 1420. Для просмотра в просвечивающем электронном микроскопе порошкообразные образцы, прокаленные при необходимой температуре, диспергировали ультразвуком в воде или метаноле. Суспензию наносили на опорные медные сетки, покрытые пленкой коллодия. Состав образцов (соотношение атомов металлов) уточняли методом энергодисперсионной рентген-флуоресцентной спектроскопии с помощью приставки элементного анализа сканирующего электронного микроскопа LEO 1420. Обработку спектров проводили с использованием встроенного программного обеспечения.

Получение коллоидных растворов наночастиц ферритов проводили с использованием ультразвуковой ванны (Сапфир, Россия) и погружного ультразвукового диспергатора (УЗГ-13-0,1/22, Россия). В качестве стабилизаторов наночастиц использовали поверхностно-активные вещества (бис(2-этилгексил) сульфосукцинат натрия, додецил сульфат натрия, додецилбензолсульфонат натрия, стеарат натрия, TWEEN80), белки (бычий сывороточный альбумин, желатин) и полиэлектролиты (поли(диаллилдиметиламмоний хлорид) (ПДДА, 100–200 кДа)); полиаллиламина гидрохлорид (ПАГ, 58,0 кДа), поли(этиленимин) (ПЭИ, 70 кДа), хитозан (ХН, $M_в$ 460 кДа, степень деацетилирования 75–85%), полистиролсульфонат натрия (ПСС, 70,0 кДа), декстрансульфат (ДекС), λ-каррагинан.

Модифицированные наночастицы ферритов отделяли от раствора стабилизатора центрифугированием (центрифуга Z 36 HK, «Hermle», Германия, 22000 мин$^{-1}$) или с помощью постоянного магнита, после чего диспергировали в небольшом объеме дистиллированной воды. Средний гидродинамический диаметр частиц Z_{av}, индекс полидисперсности PDI и ζ-потенциал наночастиц допированного магнетита определяли на приборе ZetaSizer NanoZS (Malvern, США). Распределение наночастиц по размерам рассчитывали с использованием стандартного программного обеспечения прибора. Величина d_N характеризует размер частиц, фракция которых максимально представлена в образце.

Изображения наночастиц, покрытых слоем полиэлектролита, получали при помощи сканирующего зондового микроскопа MultiMode Nanoscope III (Veeco, USA). Условия сканирования: скорость – 3–5 Гц. При сканировании использовали зонды NPS-1 из нитрида кремния с константами жесткости от 0,06 до 0,58 Н/м. Плотность информации составляла 512×512 пикселей. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Nanoscope v531. Измерения магнитных характеристик проводили с помощью Cryogen Free Measurement System Cryogenic Ltd (T = 7–300 K, H_{max} = 18 Тл).

Результаты и их обсуждение. Все полученные образцы наночастиц твердых растворов $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ представляют собой мелкодисперсные порошки черного или темно-коричневого цвета. Рентгенофазовый анализ подтверждает, что при синтезе методом соосаждения при температуре ~ 90 ºС происходит образование кристаллического однофазного соединения со структурой шпинели, рефлексы которого хорошо проявляются. Параметры кристаллической решетки полученных составов приведены в табл. 1. Наблюдаемый рост величины параметра кристаллической решетки с увеличением содержания цинка объясняется различием ионных радиусов железа, цинка и магния (r (Zn^{2+}) = 0,074 нм, r (Mg^{2+}) = 0,064 нм, r (Fe^{3+}) = 0,065 нм). Средний размер ОКР, рассчитанный по методу Шеррера (рефлекс 311), составляет ~10 нм.



а *б*

Рис. 1. Морфология наночастиц и зависимость намагниченности от индукции магнитного поля для нанопорошков $Mg_{0,1}Zn_{0,1}Fe_{2,8}O_4$, полученных методом соосаждения с Na_2CO_3

Fig. 1. Morphology of nanoparticles and the curve magnetization for nanopowders $Mg_{0,1}Zn_{0,1}Fe_{2,8}O_4$, prepared by coprecipitation with Na_2CO_3

Изображения синтезированных карбонатным соосаждением нанопорошков, сделанные на сканирующем электронном микроскопе, также свидетельствуют о прошедшем процессе их кристаллизации. Наночастицы имеют огранку, и их размер не превышает 20 нм (рис. 1, *а*), а также не зависит от химического состава частиц. Кривые намагничивания наночастиц $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ демонстрируют при температуре 300 К типичное суперпарамагнитное поведение с отсутствием коэрцитивности и остаточной намагниченности (рис. 1, *б*).

Для ряда исследованных составов твердых растворов $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ обнаружен эффект увеличения намагниченности насыщения по сравнению с незамещенным магнетитом Fe_3O_4 (M_s = 64 А·м^2·кг$^{-1}$). Такое увеличение намагниченности происходит при замещении цинком ($Zn_xFe_{3-x}O_4$) до значений x в области 0,2 (M_s = 75 А·м^2·кг$^{-1}$) и магнием ($Mg_xFe_{3-x}O_4$) до значений x в области 0,1 (M_s = 66 А·м^2·кг$^{-1}$). Смешанное замещение $[(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4]$ также приводит к росту намагниченности насыщения. Например, для состава $Mg_{0,05}Zn_{0,10}Fe_{2,85}O_4$ M_s = 70 А·м^2·кг$^{-1}$. Более высокие степени замещения приводят уже к снижению намагниченности насыщения, однако уровень значений намагниченности наночастиц сохраняется по-прежнему высоким (табл. 1).

Таблица 1. **Значения параметров решетки и намагниченности насыщения для наночастиц в системе $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$**

Table 1. **Lattice parameters and saturation magnetization values for nanoparticles in $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ system**

Состав	*a*, Å	M_S, А·м^2·кг$^{-1}$
Fe_3O_4	8,3729	64
$Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$	8,3689	–
$Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$	8,3662	66
$Mg_{0,05}Zn_{0,1}Fe_{2,85}O_4$	8,3735	70
$Mg_{0,12}Zn_{0,08}Fe_{2,8}O_4$	8,3776	59
$Mg_{0,1}Zn_{0,1}Fe_{2,8}O_4$	–	57
$Mg_{0,1}Zn_{0,2}Fe_{2,7}O_4$	8,3903	58
$Zn_{0,18}Fe_{2,82}O_4$	8,3885	75
$Zn_{0,3}Fe_{2,7}O_4$	8,3983	–

Структура магнетита Fe_3O_4 может быть представлена квазихимической формулой $(Fe^{3+})[Fe^{3+}, Fe^{2+}]O_4$, где круглые и квадратные скобки обозначают соответственно тетраэдрические и октаэдрические позиции кристаллической решетки. Для магнетита количество ионов Fe^{3+}, находящихся в окта- и тетраэдрических позициях, одинаково, и вследствие антиферромагнитного взаимодействия между ними намагниченность оксида определяется только магнитным моментом

ионов Fe^{2+}. Вместе с тем в октаэдрической подрешетке происходит постоянный обмен электронами между ионами Fe^{2+} и Fe^{3+} через гибридную орбиталь, образуемую 2*p*-орбиталью кислорода, что приводит к явлению двойного обменного взаимодействия.

В случае образования твердого раствора замещения $Zn_xFe_{3-x}O_4$ при легировании магнетита цинком ионы Zn^{2+}, имея предпочтение к тетраэдрическим позициям в решетке шпинели, замещают в ней ионы Fe^{3+}. Тогда структуру твердого раствора можно записать в виде $(Zn_x^{2+}Fe_{1-x}^{3+})\left[Fe_{1+x}^{3+}, Fe_{1-x}^{2+}\right]O_4$. В октаэдрической подрешетке появляются дополнительные ионы Fe_x^{3+}, которые имеют то же направление вектора магнитного момента (спина) неспаренных электронов, что и ионы Fe^{3+}, изначально присутствовавшие в данной подрешетке. Так как ионы Zn^{2+} не имеют неспаренного электрона, твердые растворы $Zn_xFe_{3-x}O_4$ при небольшой степени легирования, как показывают наши данные и данные других авторов [13–14], обладают повышенной намагниченностью по сравнению с чистым Fe_3O_4. Литературные данные свидетельствуют и о большей намагниченности твердого раствора замещения $Mg_xFe_{3-x}O_4$ по сравнению с Fe_3O_4, при $x = 0{,}1$ [15]. Известно, что ион Mg^{2+} так же, как и ион Zn^{2+}, не обладает магнитным моментом, но в отличие от последнего замещает в основном ионы железа в октаэдрических позициях решетки шпинели. Это должно было бы приводить к снижению намагниченности замещенного магнием магнетита вследствие уменьшения доли магнитных ионов Fe^{2+}, как следует из формулы $(Fe^{3+})\left[Fe^{3+}, Mg_x^{2+}Fe_{1-x}^{2+}\right]O_4$. В данной работе нами также установлена повышенная намагниченность твердого раствора состава $Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$ ($M_s = 66$ А·м^2·кг$^{-1}$) по сравнению с недопированным Fe_3O_4 ($M_s = 64$ А·м^2·кг$^{-1}$). Данный экспериментальный факт может свидетельствовать о том, что ионы Mg^{2+} замещают ионы Fe^{3+} не в октаэдрических, а тетраэдрических позициях кристаллической решетки в соответствии с формулой $(Mg_x^{2+}Fe_{1-x}^{3+})\left[Fe_{1+x}^{3+}, Fe_{1-x}^{2+}\right]O_4$. Как и в случае Zn-замещенного феррита, это приводит к увеличению намагниченности оксида.

В случае когда концентрация ионов Zn^{2+} в $Zn_xFe_{3-x}O_4$ превышает $x = 0{,}2$, а ионов Mg^{2+} в случае $Mg_xFe_{3-x}O_4$ $x = 0{,}1$, в октаэдрической подрешетке начинается антиферромагнитное взаимодействие имевшихся ионов Fe_x^{3+} с вновь поступающими ионами Fe_x^{3+}. Направление векторов магнитных моментов электронов последних становится противоположным имевшимся. Такое взаимодействие определяется как сверхобменное. Таким образом, ионы Fe_x^{3+} с антипараллельными спинами уже не вносят вклад в общий магнитный момент и намагниченность твердых растворов $Zn_xFe_{3-x}O_4$ или $Mg_xFe_{3-x}O_4$ уменьшается при возрастании параметра замещения *x* до определенного критического значения (рис. 2). При таких и бóльших значениях *x* сверхобменные взаимодействия через 2*p*-орбиталь кислорода становятся преобладающими над двойными взаимодействиями между ионами Fe^{3+} (окта) и Fe_x^{3+} (окта) и намагниченность для твердых растворов $Zn_xFe_{3-x}O_4$ и $Mg_xFe_{3-x}O_4$ снижается.

Вместе с тем установлено, что в случае совместного замещения магнетита ионами Mg^{2+} и Zn^{2+} с образованием твердого раствора состава $Zn_xMg_yFe_{3-x-y}O_4$, снижения намагниченности

Тетраэдрические позиции		Октаэдрические позиции		
$(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$	$(Mg^{2+}, Zn^{2+})\,Fe^{3+}$	Fe_{1-x}^{3+}	Fe_x^{3+}	Fe_{1-x}^{2+}
Fe_3O_4	↓↓↓↓↓ ↓↓↓↓↓	↑↑↑↑↑ ↑↑↑↑↑		↑↑↑↑↑ ↑↑↑↑↑
$Zn_{0,1}Fe_{2,9}O_4$	↓↓↓↓□ ↓↓↓↓↓	↑↑↑↑↑ ↑↑↑↑↑	↑	↑↑↑↑ ↑↑↑↑↑
$Zn_{0,3}Fe_{2,7}O_4$	↓↓□□□ ↓↓↓↓↓	↑↑↑↑↑ ↑↑↑↑↑	↑↓↓	↑↑ ↑↑↑↑↑
$(Mg, Zn)_{0,3}Fe_{2,7}O_4$	↓↓□□□ ↓↓↓↓↓	↑↑↑↑↑ ↑↑↑↑↑	↑↑↓	↑↑ ↑↑↑↑↑

Рис. 2. Схема замещения ионов железа ионами Mg^{2+}, Zn^{2+} в твердых растворах $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ (магнитные моменты ионов: Fe^{3+} – 5 μ_B; Fe^{2+} – 4 μ_B; Mg^{2+}, Zn^{2+} – 0 μ_B)

Fig. 2. Substitution scheme of iron ions for Mg^{2+}, Zn^{2+} in $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ solid solutions (magnetic moments of ions: Fe^{3+} – 5 μ_B; Fe^{2+} – 4 μ_B ; Mg^{2+}, Zn^{2+} – 0 μ_B)

не происходит даже при значении $x + y$, достигающего 0,3. Например, для состава $Zn_{0,2}Mg_{0,1}Fe_{2,7}O_4$ величина намагниченности M_s = 58 А·м^2·кг$^{-1}$. Очевидно, что в этом случае имеет место синергический эффект взаимного влияния допирующих ионов и, вероятно, проявляется стабилизирующее действие ионов Mg^{2+} на структуру Fe_3O_4. Данный факт может быть связан с тем, что ионный радиус ионов Mg^{2+} (0,064 нм) соизмерим с радиусом ионов Fe^{3+} (0,065 нм) в отличие от ионов Zn^{2+}, которые имеют больший размер (0,074 нм). Поэтому замещение ионов железа ионами цинка приводит к понижению стабильности кристаллической структуры шпинели.

Исследование характеристик модифицированных наночастиц. В водных растворах синтезированные порошки твердых растворов ферритов формируют трудноразделимые агрегаты частиц, которые седиментационно неустойчивы. Суспензии немодифицированных наночастиц характеризуются мультимодальным распределением по размерам с высоким индексом полидисперсности (PDI > 0,4). Эффективный гидродинамический диаметр частиц в них превышает 1,5 мкм (табл. 2). Для немодифицированных частиц в воде характерны невысокие значения ζ-потенциала, недостаточные для электростатической стабилизации взвешенных частиц в воде. Различие ζ-потенциала нестабилизированных ферритов связано с изменением состава поверхности частиц в замещенных ферритов по сравнению с магнетитом, а именно возрастанием числа кислотных центров [16, 17]. Это приводит к уменьшению изоэлектроической точки pI частиц.

Таблица 2. **Характеристики дисперсий наночастиц (Mg, Zn)$_x$Fe$_{3-x}$O$_4$**

Table 2. **Characteristics of (Mg, Zn)$_x$Fe$_{3-x}$O$_4$ nanoparticle dispersions**

Состав образца	Без стабилизатора				УЗ диспергирование, ПДДА*			
	Z_{av}, нм	PDI	d_N, нм	ζ-потенциал, мВ	Z_{av}, нм	PDI	d_N, нм	ζ-потенциал, мВ
$Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$	2066±427	0,629±0,280	1281	–0,7±0,1	147,4±6,4	0,229±0,006	58,7	45,8±1,4
$Mg_{0,12}Zn_{0,08}Fe_{2,8}O_4$	1751±333	0,445±0,240	1484	–1,6±0,1	200,7±27,1	0,315±0,008	78,8	29,6±2,6
$Mg_{0,1}Zn_{0,2}Fe_{2,7}O_4$	2138±556	0,538±0,260	1281	–2,7±0,2	251,8±35,7	0,365±0,045	58,8	32,7±2,6
Fe_3O_4	1850±578	0,688±0,233	1281	13,1±1,0	125,6±10,5	0,263±0,043	68,1	42,0±2,0

Примечание. $^*C_{ПДДА}/C_{Zn_xMg_yFe_{3-x-y}O_4}$ = 10.

При ультразвуковом диспергировании порошков в воде циклические изменения давления в кавитационных пузырьках и трение соударяющихся частиц вызывают локальные механические напряжения в материале дисперсной фазы, в результате чего расширяются уже имеющиеся и образуются новые микротрещины, что приводит к увеличению дисперсности порошков [18]. Стабилизаторы, присутствующие в растворе, адсорбируются на поверхности наночастиц и препятствуют их агрегированию [19].

Максимум распределения частиц после ультразвуковой обработки в растворах низкомолекулярных поверхностно-активных веществ превышает 100 нм, при этом после отделения от раствора стабилизатора наночастицы необратимо коагулируют. Растворы белков, альбумина и желатина позволяют получить частицы $Zn_{0,08}Mg_{0,12}Fe_{2,8}O_4$ субмикронных размеров. Максимум распределения частиц в растворе бычьего сывороточного альбумина находится в диапазоне 155–164 нм, а после отделения частиц от избытка белка средний гидродинамический диаметр частиц увеличивается до 350–380 нм. В растворе желатина он составляет 350–410 нм. После 12 сут хранения при комнатной температуре все растворы наночастиц, стабилизированных белками, коагулируют.

Наночастицы с узким распределением по размерам (PDI < 0,250), средний диаметр которых по светорассеиванию Z_{av} не превышает 200 нм (табл. 3), были получены диспергированием порошка $Zn_{0,08}Mg_{0,12}Fe_{2,8}O_4$ в растворах полиэлектролитов. На диаграммах распределения частиц по размерам преобладают наночастицы с размерами от 38 до 80 нм, а для 99,5–100% частиц гидродинамический диаметр составляет менее 200 нм. Увеличение отношения концентрации стабилизатора к твердому раствору феррита от 5 до 10 г/г уменьшает средний диаметр частиц на 23±13 %. После отделения избытка полиэлектролита диаметр наночастиц $Zn_{0,08}Mg_{0,12}Fe_{2,8}O_4$, покрытых слоем положительно заряженного полиэлектролита, в дистиллированной воде практически не изменяется в течение 45 сут. Коллоидные растворы, полученные диспергированием в растворах отрицательно заряженных полиэлектролитов, устойчивы в течение ограниченного периода времени (3–5 сут).

Таблица 3. **Характеристики коллоидных растворов наночастиц $Zn_{0,08}Mg_{0,12}Fe_{2,8}O_4$, стабилизированных поликатионами**

Table 3. **Characteristics of $Zn_{0,08}Mg_{0,12}Fe_{2,8}O_4$ nanoparticle colloidal solutions stabilized by polycations**

Стабилизатор	$\frac{C_{стаб\text{-}тор}}{C_{мнч}}$, г/г	Время, дней					
		1			45		
		Z_{av}, нм	PDI	d_N, нм	Z_{av}, нм	PDI	d_N, нм
–	–	2104±222	0,373±0,146		–		
ПДДА	5	144,8±2,5	0,219±0,042	44,0	113,3±3,8	0,147±0,027	68,1
	10	117,2±4,7	0,231±0,063	78,8	107,2±1,2	0,215±0,008	58,8
ПАГ	5	109,6±1,5	0,386±0,002	59,0	131,9±3,3	0,256±0,033	78,8
	10	95,09±3,2	0,227±0,008	58,8	104,4±3,8	0,207±0,010	58,8
ПЭИ	5	201,9±1,8	0,149±0,008	190	240,1±4,7	0,266±0,017	105,7
ХН	5	146,3±3,9	0,295±0,028	41,0	–		
	10	90,6±3,7	0,198±0,022	58,8	95,6±1,1	0,174	61,6

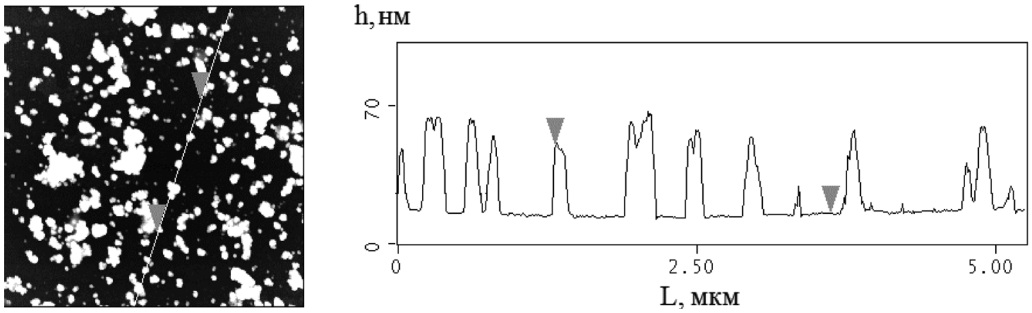


Рис. 3. СЗМ изображение и профиль по высоте для наночастиц $Zn_{0,08}Mg_{0,12}Fe_{2,8}O_4$, покрытых слоем ПАГ

Fig. 3. SPM image and height profile for $Zn_{0,08}Mg_{0,12}Fe_{2,8}O_4$ nanoparticles covered by (poly)allyl amine hydrochloride

Согласно данным сканирующей зондовой микроскопии, образец наночастиц $Zn_{0,08}Mg_{0,12}Fe_{2,8}O_4$, покрытых слоем поликатиона ПАГ, состоит из неагломерированных частиц диаметром менее 100 нм (рис. 3). Наибольшее число частиц имеет размеры от 30 до 60 нм, которым соответствуют максимумы на диаграммах распределения частиц по размерам, рассчитанные по светорассеиванию (табл. 2). Также присутствует небольшая доля мелких (менее 30 нм) и более крупных частиц или агломератов с диаметром до 200 нм.

Устойчивые коллоидные растворы наночастиц $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ характеризуются высокими положительными значениями ζ-потенциала наночастиц (табл. 2), указывающими, что макромолекулы поликатиона прочно адсорбированы на их поверхности. Толщина такого слоя поликатиона зависит от его природы и условий адсорбции и может составлять 0,5–3,0 нм [19].

Заключение. Суперпарамагнитные наночастицы твердых растворов состава $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ ($x \leq 0,3$) со средним размером около 20 нм синтезировали методом соосаждения с использованием карбоната натрия в качестве осадителя. В результате были получены однофазные твердые растворы со шпинельной структурой, параметр решетки в которых возрастает с ростом содержания цинка. Установлено, что замещение катионов железа в магнетите Fe_3O_4 ионами цинка и магния приводит к росту намагниченности насыщения, в случае $Mg_xFe_{3-x}O_4$ до $x = 0,1$, а в случае $Zn_xFe_{3-x}O_4$ – до $x = 0,2$. В этом случае ионы Fe_x^{3+} в тетра-подрешетке замещаются ионами Zn^{2+} или Mg^{2+}, а ионы Fe^{2+} окисляются до ионов Fe_x^{3+} для сохранения электронейтральности, при этом направление их спина не изменяется. Дальнейшее увеличение степени замещения приводит к появлению в окта-подрешетке ионов Fe_x^{3+} с антипараллельной ориентацией спинов, в результате чего между ионами Fe^{3+} с противоположно направленными спинами возникает сверхобменное взаимодействие, приводящее к снижению намагниченности насыщения $Mg_xFe_{3-x}O_4$ и $Zn_xFe_{3-x}O_4$. Обнаружено, что в случае совместного замещения ионов железа в магнетите для системы $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ вплоть до $x = 0,3$ значения намагниченности насыщения незначительно

снижаются относительно магнетита, однако остаются на постоянном уровне. Причиной этого может служить стабилизирующее действие замещающих ионов Mg^{2+}, радиус которых мало отличается от радиуса ионов Fe^{3+}.

Неагломерированные частицы $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ получали ультразвуковым диспергированием синтезированных порошков в водных растворах полиэлектролитов. Наилучшей седиментационной устойчивостью (до 45 дней) и узким распределением по размерам обладают системы, полученные при модификации поверхности наночастиц слоем положительно заряженного полиэлектролита. В коллоидных растворах преобладают наночастицы с размерами от 38 до 80 нм, а для 99,5–100% частиц гидродинамический диаметр не превышает 200 нм.

Такие наночастицы будут обладать высокой биосовместимостью в результате низкого концентрационного порога контрастирующего действия, снижения токсичности оксидной фазы и использования биополимеров для формирования оболочки, которая также придаст наночастицам требуемую агрегативно-седиментационную устойчивость.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Х15МС-018).

Acknowledgements

This work has been performed with financial support of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant № Х15МС-018)

Список использованных источников

1. Наноматериалы на основе твердых растворов ферритов для низкочастотной магнитной гипертермии злокачественных опухолей / Д. А. Котиков [и др.] // Свиридовские чтения: сб. ст. – Минск: НИИФХП БГУ, 2012. – Вып. 8. – С. 59–67.

2. Першина, А. Г. Использование магнитных наночастиц в биомедицине / А. Г. Першина, А. Э. Сазонов, И. В. Мильто // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 2. – С. 70–78.

3. Соснов, А. В. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц / А. В. Соснов, Р. В. Иванов, К. В. Балакин // Качественная клиническая практика. – 2008. – № 2. – С. 4–12.

4. Ultrasensitive detection and molecular imaging with magnetic nanoparticles / J. Yang [et al.] // The Analyst. – 2008. – Vol. 133. – P.154–160.

5. Wan, J. Facile synthesis of zinc ferrite nanoparticles as non-lanthanide T1 MRI contrast agents / J. Wan, X. Jiang, H. Li, K. Chen // J. Mater. Chem. – 2012. – Vol.22. – P. 13500–13505.

6. Zinc ferrite nanoparticles as MRI contrast agents / C. Barcena [et al.] // Chem. Commun. – 2008. – P. 2224–2226.

7. New environmental non-toxic agents for preparation of core-shell magnetic nanoparticles / A. E. Chekanova [et al.] // Mendeleev Commmunication. 2009. – Vol. 19. – P. 1–4.

8. Preparation of $ZnFe_2O_4$ nanoparticles in the template of silk-fibroin peptide and their neuro-cytocompability in PC12 cells / J. Liu [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2013. – Vol. 107. – P. 19–26.

9. Petrova, E. Non-agglomerated magnetic nanoparticles for biodetection, imaging and drug delivery / E. Petrova, D. Kotikov, V. Pankov // Proc. 14th European Conf. Solid State Chem. Bordeaux. – Paris, NISC, 2013. – P. 65.

10. Structure and magnetic properties of manganese–zinc-ferrites prepared by spray pyrolysis method / D. Kotsikau [et al.] // Solid State Sci. – 2015. – Vol. 39. – P. 69–73.

11. Паньков, В. В. Физико-химические процессы синтеза многокомпонентных оксидов для создания новых функциональных магнитных и проводящих материалов / В. В. Паньков // Вестник БГУ. Сер. 2. – 2011. – № 3. – С. 30–37.

12. Structure, morphology and magnetic properties of $Mg_xZn_{1-x}Fe_2O_4$ ferrites prepared by polyol and aqueous coprecipitation methods: a low-toxicity alternative to $Ni_xZn_{1-x}Fe_2O_4$ ferrites / A. Daigle [et al.] // Nanotech. – 2011. – Vol. 22. – P. 305708.

13. Liu, J. Magnetic behavior of Zn-Doped Fe_3O_4 nanoparticles estimated in terms of crystal domain size / J. Liu, Y. Bin, M. Matsuo // J. Phys. Chem. C. – 2012. – Vol. 116 (1). – P. 134–143.

14. Petrova, E. Structural characterization and magnetic properties of sol-gel derived $Zn_xFe_{3-x}O_4$ nanoparticles / E. Petrova, D. Kotsikau, Vol. Pankov // JMMM. – 2015. – Vol. 378. – P. 429–435.

15. Magnetic Behaviors of Mg- and Zn-Doped Fe_3O_4 Nanoparticles Estimated in Terms of Crystal Domain Size, Dielectric Response, and Application of Fe_3O_4/Carbon Nanotube Composites to Anodes for Lithium Ion Batteries / Z. Lv [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2015. – Vol. 119 (46). – P. 26128–26142.

16. Карпова, С. С. Исследование влияния кислотно-основных свойств поверхности оксидов ZnO, Fe_2O_3 и $ZnFe_2O_4$ на их газочувствительность по отношению к парам этанола / С. С. Карпова и др. // Физика и техника. – 2013. – Т. 47 (8). – С. 1022–1026.

17. Sanpo, N. Biocompatibility of transition metal-substituted cobalt ferrite nanoparticles / N. Sanpo [et al.] // J. Nanopart. Res. – 2014. – Vol. 16. – P. 2510–2522.

18. Santos, H. M. Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications / H. M. Santos, C. Lodeiro, J. L. Capello-Martinez // J. L. Capelo-Martinez Ed. – Wiley-VCH: Weinheim. – 2009. – P. 1–16.

19. Lvov, Y. Making aqueous nanocolloids from low soluble materials: LbL shells on nanocores. / Y. Lvov, P. Pattekari, T. Shutava // Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials / Eds. G. Decher, J. Schlenoff. – Wiley-VCH, NY, London, 2012. – Chapter 14. – P. 151–170.

References

1. Kotikov D. A., Pan'kov V. V., Ivanovskaia M. I., Kashevskii B. E., Kashevskii S. B., Petrova E. G., "Nanomaterials based on ferrite solid solutions for low-frequency magnetic hyperthermia of malignant tumors", *Sviridovskie chteniia : sb. st. Vyp. 8* [Sviridov Readings: collection of papers, Issue. 8], BGU, Minsk, BY, 2012, pp. 59–67.

2. Pershina A. G., Sazonov A. E., Mil'to I. V., "Use of magnetic nanoparticles in biomedicine", *Biulleten' sibirskoi meditsiny* [Bulletin of Syberia medicine], 2008, no. 2, pp. 70–78.

3. Sosnov A. V., Ivanov R. V., Balakin K. V., "Development of drug delivery systems using micro- and nanoparticles", *Kachestvennaia klinicheskaia praktika* [Good clinical practice], 2008, no. 2, pp. 4–12.

4. Yang J., Gunn J., Shivang R., Zhang M., Wangc Y. A., Gao X., "Ultrasensitive detection and molecular imaging with magnetic nanoparticles", *Analyst*, 2008, vol. 133, pp. 154–160.

5. Wan J., Jiang X., Li H., Chen K., "Facile synthesis of zinc ferrite nanoparticles as non-lanthanide T1 MRI contrast agents", *Journal of Materials Chemistry*, 2012, vol. 22, pp. 13500–13505.

6. Barcena C., Sra A. K., Chaubey G. S., Khemtong C., Liu J. P., Gao J., "Zinc ferrite nanoparticles as MRI contrast agents", *Chemical Communications*, 2008, pp. 2224–2226.

7. Chekanova A. E., Sorkina T. V., Nikiforov V. N., Davidova G. A., "New environmental non-toxic agents for preparation of core-shell magnetic nanoparticles", *Mendeleev Commmunication*, 2009, vol. 19, pp. 1–4.

8. Liu J., Deng M., Huang Z., Yin G., Liao X., Gu J., "Preparation of ZnFe2O4 nanoparticles in the template of silk-fibroin peptide and their neuro-cytocompability in PC12 cells", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, vol. 107, pp. 19–26.

9. Petrova E., Kotikov D., Pankov V., "Non-agglomerated magnetic nanoparticles for biodetection, imaging and drug delivery", *14th European Conference on Solid State Chemistry, Bordeaux, 7-10 July 2013, France*, NISC, Paris, FR, 2013, p. 65.

10. Kotsikau D., Ivanovskaya M., Pankov V., Fedotova Y., "Structure and magnetic properties of manganese–zinc-ferrites prepared by spray pyrolysis method", *Solid State Sciences*, 2015, vol. 39, pp. 69–73.

11. Pan'kov V. V., "Physico-chemical processes of multicomponent oxide synthesis for development of new functional magnetic and conducting materials", *Vestnik BGU. Seriia 2* [Bulletin of the Belarusian State University. Series 2], 2011, no. 3, pp. 30–37.

12. Daigle A., Modest J., Geiler A., Gillette S., Chen Y., Geiler M., Hu B., Kim S., Stopher K., Vittoria C., Harris V. G., "Structure, morphology and magnetic properties of MgxZn1-xFe2O4 ferrites prepared by polyol and aqueous coprecipitation methods: a low-toxicity alternative to NixZn1-xFe2O4 ferrites", *Nanotechnology*, 2011, vol. 22, no. 30, p. 305708.

13. Liu J., Bin Y., Matsuo M., "Magnetic behavior of Zn-Doped Fe3O4 nanoparticles estimated in terms of crystal domain size", *Journal of Physical Chemistry C*, 2012, vol. 116, no. 1, pp. 134–143.

14. Petrova E., Kotsikau D., Pankov V., "Structural characterization and magnetic properties of sol-gel derived ZnxFe3-xO4 nanoparticles", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2015, vol. 378, pp. 429–435.

15. Lv Zh., Wang Q., Bin Yu., Huang L., Zhang R., Zhang P., Matsuo M., "Magnetic Behaviors of Mg- and Zn-Doped Fe3O4 Nanoparticles Estimated in Terms of Crystal Domain Size, Dielectric Response, and Application of Fe3O4/Carbon Nanotube Composites to Anodes for Lithium Ion Batteries", *Journal of Physical Chemistry C*, 2015, vol. 119, no. 46, pp. 26128–26142.

16. Karpova S. S., Moshnikov V. A., Maksimov A. I., Miakin S. V., Kazantseva N. E., "Investigation of the effect of acid-base properties of ZnO, Fe2O3 and ZnFe2O4 surface on their gas sensitivity toward ethanol vapours", *Fizika i tekhnika poluprovodnikov* [Physics and technology of semiconductors], 2013, vol. 47, no. 8, pp. 1022–1026.

17. Sanpo N., Tharajak J., Li Y., Berndt Ch. C., Wen C., Wang Ja. Y., "Biocompatibility of transition metal-substituted cobalt ferrite nanoparticles", *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, vol.16, no. 7, pp. 2510–2522.

18. Capello-Martinez J. L. (ed.), *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, DE, 2009.

19. Lvov Y., Pattekari P., Shutava T., "Making aqueous nanocolloids from low soluble materials: LbL shells on nanocores", in Decher G., Schlenoff J. (ed.), *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, Wiley-VCH, NY, London, UK, 2012, Chapter 14, pp. 151–170.

Информация об авторах

Паньков Владимир Васильевич – д-р хим. наук, проф., зав. кафедрой физ. химии, Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pankov@bsu.by.

Шутова Татьяна Геннадьевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tshutova@yahoo.com.

Ливонович Константин Сергеевич – магистр хим. наук, мл. науч. сотрудник, Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: konstantin.livonovich@yandex.by.

Information about the authors

Pankov Vladimir Vasilevich – D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Physical Chemistry Department, Belarusian State University (14 Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pankov@bsu.by.

Shutava Tatsiana Gennad'evna – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36 F. Skaryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tshutova@yahoo.com.

Livanovich Kanstantsin Sergeevich – M. Sc. (Chemistry), Junior Researcher, Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36 F. Skaryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: konstantin.livonovich@yandex.by.

Котиков Дмитрий Анатольевич – кандидат хим. наук, доцент, Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kotsikau@bsu.by.

Петрова Елена Геннадьевна – магистр хим. наук, аспирант, Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: petrovaeg@bsu.by.

Натаров Валентин Олегович – магистрант, Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: che.natarovVO@bsu.by.

Труханов Сергей Валентинович – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник, Научно-практический центр НАН Беларуси по материаловедению (ул. П. Бровки, 19, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: truhanov@ifttp.bas-net.by.

Для цитирования

Синтез и функционализация поверхности магнитных наночастиц $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}$ / В. В. Паньков [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 15–24.

Kotsikau Dzmitry Anatolevich – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Belarusian State University (14 Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kotsikau@bsu.by.

Petrova Elena Gennad'evna – M. Sc. (Chemistry), Ph. D. student, Belarusian State University (14 Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: petrovaeg@bsu.by.

Natarov Valentin Olegovich – Master student, Belarusian State University (14 Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: che.natarovVO@bsu.by.

Trukhanov Sergei Valentinovich – Ph.D. (Physics), Senior Researcher, Scientific-Practical Materials Research Centre of the National Academy of Sciences of Belarus (19 P. Brovka Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: truhanov@ifttp.bas-net.by.

For citation

Pankov V. V., Shutava T. G., Livanovich K. S., Kotsikau D. A., Petrova E. G., Natarov V. O., Trukhanov S. V. $(Mg, Zn)_xFe_{3-x}O_4$ nanoparticles: synthesis, magnetic properties, surface functionalization. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 15–24. (In Russian).

ISSN 0002-3590 (print.)

КАЛОІДНАЯ ХІМІЯ

COLLOIDAL CHEMISTRY

УДК 541.18.043.5: 667.612.32

Поступила в редакцию 20.10.2016
Received 20.10.2016

И. П. Кажуро, В. Д. Кошевар, Н. А. Симаш

Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ГРАНУЛОМЕТРИЧЕСКИЙ СОСТАВ И СЕДИМЕНТАЦИОННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ СМЕШАННЫХ ВОДНО-ДИСПЕРСИОННЫХ СИСТЕМ ПОЛИСИЛОКСАН–МИНЕРАЛЬНЫЙ ПОРОШОК

Методами турбидиметрии и гранулометрического анализа изучена устойчивость водных дисперсий полиорганосилоксана и TiO_2 или слюды как в присутствии ПАВ, так и без них при pH 6,7 и 8,7. Агрегативная устойчивость систем латекс–TiO_2 при увеличении концентрации дисперсной фазы растет, а для системы латекс–слюда падает. Введение ПАВ анионного и неионогенного типов в смешанные дисперсии (pH 6,7) приводит к повышению их диспергируемости. Повышение pH дисперсионной среды существенно улучшает диспергируемость порошков в латексах, не содержащих диспергаторы.

Ключевые слова: водно-дисперсионная смешанная система, седиментационная стабильность, минеральный порошок, полиорганосилоксан.

I. P. Kazhuro, V. D. Koshevar, N. A. Simash

Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

GRANULOMETRIC COMPOSITION AND SEDIMENTATION STABILITY OF WATER DISPERSION POLYSILOXANE–MINERAL POWDER SYSTEMS

Stability of water dispersions of a polyorganosiloxane and TiO_2 or mica both in presence of surfactants and without them has been studied at pH 6.7 and 8.7 by nephelometry and granulometry. Aggregate stability of latex-TiO_2 system increases with disperse phase concentration, while decreasing for the latex-mica system. Introduction of anionic and nonionic surfactants into mixed dispersions (pH 6.7) leads to increase. Increase of dispersant pH significantly improves dispersancy of powders in the latex without dispersing agent.

Keywords: water dispersions composite system, sedimentation stability, mineral powder, (poly)organosiloxane.

Введение. Полиорганосилоксаны (силиконы) являются универсальными пленкообразующими материалами с большим разнообразием свойств: низкой поверхностной энергией, высокой термостойкостью, низкой температурой стеклования, прозрачностью для УФ-излучения и т. п. Эти свойства позволяют использовать их при создании защитных покрытий для изделий из металла, бетона, керамики, дерева, в том числе стойких к атмосферным воздействиям, УФ-излучению, температурным колебаниям, электромагнитному излучению. В то время как органорастворимые полиорганосилоксаны интенсивно используются с середины прошлого столетия, водоразбавляемые полимеры этого класса, например для создания защитных материалов, не имеют столь широкого применения, хотя потребность в экологически полноценных пожаровзрывобезопасных пленкообразователях с каждым годом возрастает. Это обусловлено недостаточным вниманием исследователей к проблемам устойчивости водных эмульсий силиконов и особенно влиянием на нее химической природы различных минеральных микрочастиц, вводимых в их состав при пигментировании.

Актуальной задачей современного материаловедения является разработка материалов на основе силиконовых эмульсий, устойчивых к высокотемпературным воздействиям. Для создания

© Кажуро И. П., Кошевар В. Д., Симаш Н. А., 2017

таких материалов важно понимать, какие коллоидно-химические явления могут происходить при введении тех или иных инородных компонентов в эти эмульсии. В связи с этим в настоящей работе уделено внимание исследованию диспергируемости минеральных порошков и устойчивости систем водная дисперсия метилфенилполисилоксановой смолы–минеральный порошок.

Материалы и методы исследования. В работе использовали искусственный латекс марки «SILICOPHENP 40/W» («Эвоник Хими», Германия), представляющий собой водную эмульсию метилфенилполисилоксановой смолы со средним размером частиц 2 мкм. Для получения устойчивых смешанных дисперсий (суспензий минеральных порошков в латексе) применяли дополнительно диспергаторы анионного и неионогенного типов. Основные характеристики этих веществ приведены в табл. 1.

Таблица 1. **Физико-химические характеристики латекса и диспергаторов**

Table 1. **Physico-chemical characteristics of latex and dispersants**

Показатель	Наименование вещества		
	SILICOPHENP 40/W	Оротан 4045	LCN
Химическое название	Метилфенилполисилоксан	Натриевая соль карбоксилата	Алкилполиэтиленгликолевый эфир
Плотность, г/см^3	1,1	1,10	1,08
Вязкость, мПа·с	35	850	650
pH	5,9	7,02	8,25
Содержание нелетучих веществ, %	50	45	70
Заряд иона	Неионогенный	Анионный	Неионогенный

В качестве инородной дисперсной фазы (ДФ) использовали минеральные неорганические порошки диоксида титана («Крымский титан», Россия) и слюды мусковит («Геоком», Россия), которые широко применяются в качестве объектов исследования в модельных системах и в производстве лакокрасочных материалов (ЛКМ). Некоторые характеристики их приведены в табл. 2.

Таблица 2. **Свойства используемых минеральных порошков**

Table 2. **Properties of mineral powders used**

Показатель	Минеральный порошок	
	диоксид титана	слюда мусковит
Химическая формула	TiO_2	$K_2O{\cdot}2Al_2O_3 6SiO_2{\cdot}2H_2O$
Форма частиц	Сфера	Пластина
Плотность, г/см^3	4,26	2,82
pH 10%-ной водной вытяжки	6,8	8,4
Средний диаметр частиц, мкм	3	5

Дисперсии латекса различной концентрации получали методом разбавления исходного латекса дистиллированной водой с заданным значением pH. Таким же путем получали дисперсии метилфенилполисилоксановой смолы с концентрациями 0,05 и 0,1%. Предварительно установлено, что оптическая плотность 0,05 и 0,1% дисперсий смолы составляет 1,27 отн. ед. и не изменяется в течение всего времени эксперимента.

Для получения низкоконцентрированных смешанных дисперсий, что является необходимым при использовании турбидиметрического анализа, к навескам порошков прибавляли фиксируемый объем дисперсионной среды (латекс метилфенилполисилоксановой смолы в воде с концентрацией 0,05 и 0,1%), содержимое перетирали в агатовой ступке с получением пасты. Далее пасту вводили в дисперсионную среду (суммарный объем дисперсии составлял 400 мл) и подвергали периодическому перемешиванию в течение 24 ч. Непосредственно перед измерением смесь дополнительно диспергировали на лабораторной диспергирующей установке ЛДУ 3МПР (Россия) при скорости 300 об/мин в течение 10 мин.

Определение гранулометрического состава производили на автоматическом фотоседиментометре ФСХ-4 (Россия) с программным обеспечением «Лабнаучприбор». Теоретическую основу метода измерений на данном приборе составляют уравнения Ламберта–Бера и Стокса.

Метод турбидиметрии применяли для регистрации изменения во времени оптических плотностей (*D*) дисперсий. Для этого использовали фотоэлектрический концентрационный колориметр КФК-3МП. Измерение проводили при следующих условиях: длина волны падающего излучения – 399 нм, толщина кюветы – $1 \cdot 10^{-2}$ м. Исключение эффекта вторичного рассеяния света частицами достигали разбавлением системы (содержание полимера и минеральных веществ не превышала 5%). Измерение pH проводили на pH-метре HANNA Instruments HI 221 со стеклянным комбинированным электродом HI 1131P. Постоянное значение pH устанавливалось в течение 1–2 мин.

Экспериментальная часть. На рис. 1 представлены кривые изменения оптической плотности для систем латекс–TiO_2 с различным содержанием минеральной дисперсной фазы (ДФ) и латекса 0,05 (*а*) и 0,1% (*б*) при pH 6,7.

Значение оптической плотности для индивидуального латекса с концентрацией 0,05 и 0,1% составляет соответственно 1,3 и 1,35 отн. ед. Как следует из рис. 1, для всех систем с различной концентрацией TiO_2 наблюдается падение оптической плотности после некоторого инкубационного периода 0–10 мин, обусловленного, по-видимому, преодолением сил отталкивания при сближении частиц и их агрегирования. Наибольшее снижение оптической плотности наблюдается от 1,33 до 0,51 отн. ед. для систем с концентрацией латекса 0,05% и от 1,29 до 0,52 отн. ед. для композиций с концентрацией латекса 0,1%. Для этих случаев содержание ДФ TiO_2 составляло 0,3 %. С увеличением концентрации латекса и TiO_2 наблюдается некоторая тенденция к повышению устойчивости данной смешанной дисперсии.

Наряду с исследованием изменения оптической плотности систем определяли и их гранулометрический состав, что позволяет судить о диспергируемости TiO_2 в латексной среде при данном pH (табл. 3).

Таблица 3. **Гранулометрический состав смешанных дисперсий латекс–TiO_2 при pH 6,7**

Table 3. **Granulometric composition of latex–TiO_2 mixed dispersions at pH 6.7**

Размер частиц, мкм	Массовое содержание частиц при концентрации латекса, %			
	0,05		0,1	
	концентрация ДФ, %			
	0,3	1,0	0,3	1,0
0–10	79,7	24,6	64,3	35,4
10–20	0,8	–	20,2	2,7
20–40	1,7	6,9	15,5	6,4
40–65	2,0	4,0	–	8,7
65–100	3,3	21,8	–	16,6
>100	12,4	42,5	–	30,1

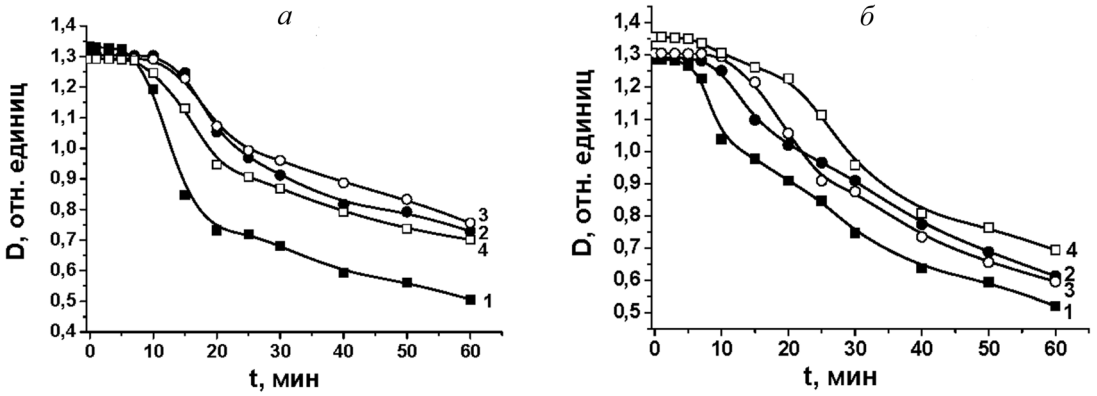


Рис. 1. Изменение оптической плотности (*D*) смешанных дисперсий латекса и TiO_2 во времени (*t*) от концентрации латекса (*а* – 0,05 %; *б* – 0,1%) и концентрации пигмента: *1* – 0,3%; *2* – 0,5; *3* – 0,7; *4* – 1,0%

Fig. 1. Change of latex-TiO_2 mixed dispersion optical density (*D*) in time (*t*) depending upon latex concentration (*а* – 0.05%; *б* – 0.1%) and pigment concentration: *1* – 0.3%; *2* – 0.5; *3* – 0.7; *4* – 1.0%

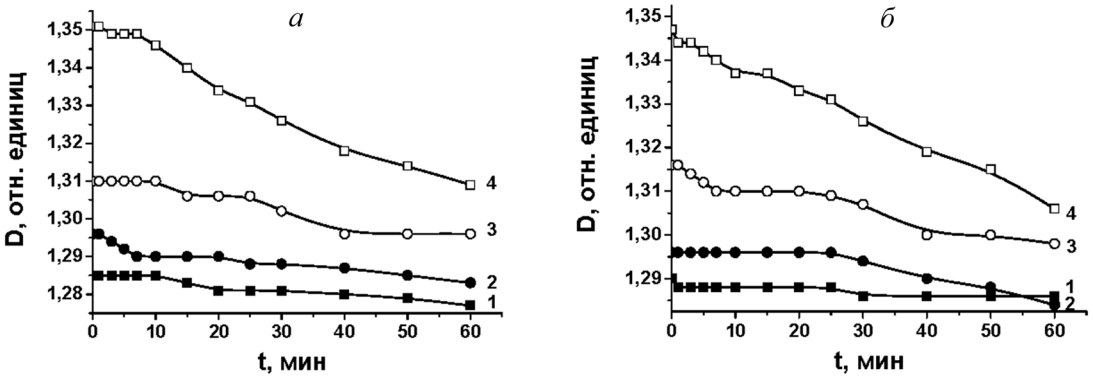


Рис. 2. Изменение оптической плотности (*D*) смешанных дисперсий латекса и слюды от времени (*t*) с концентрацией латекса: *а* – 0,05%, *б* – 0,1%; концентрацией порошка: *1* – 0,3%; *2* – 0,5; *3* – 0,7; *4* – 1,0%

Fig. 2. Change of latex-mica mixed dispersion optical density (*D*) in time (*t*) with latex concentration: *а* – 0.05%; *б* – 0.1%; and powder concentration: *1* – 0.3%; *2* – 0.5; *3* – 0.7; *4* – 1.0%

Как следует из таблицы, для систем с концентрацией латекса 0,05% содержание наиболее мелких фракций 0–10 мкм заметно уменьшается с ростом концентрации минеральной ДФ. Аналогичная картина наблюдается для дисперсий с содержанием латекса 0,1%. При этом в обоих случаях зафиксировано появление фракции с размером > 60 мкм.

Из литературных данных известно [1–5], что диоксид титана содержит частицы коллоидных размеров (< 1 мкм), которые могут служить связующим звеном при некотором структурообразовании даже при таких небольших содержаниях пигмента. Именно образование такой структурной сетки может привести к некоторой стабилизации системы.

Аналогичным образом исследовали системы латекс–слюда (рис. 2). В данном случае установлен несколько иной характер зависимости *D* от времени при различных концентрациях полимера и слюды. В частности, наблюдается менее заметное падение оптической плотности во времени, что может указывать на относительно более высокую агрегативную устойчивость системы латекс–слюда. Увеличение концентрации латекса в исследуемом диапазоне (0,05–0,1%) не оказывает существенного влияния на характер изменения оптической плотности. Еще одним отличием по сравнению с системой латекс–TiO_2 является снижение агрегативной устойчивости во всем интервале роста содержания слюды.

Гранулометрический состав дисперсий латекс–слюда приведен в табл. 4. Анализ гранулометрического состава смешанных дисперсий латекс–слюда указывает на соответствие его характеру изменения и их агрегативной устойчивости (рис. 2).

Таблица 4. **Гранулометрический состав смешанных дисперсий латекс–слюда при pH 6,7**

Table 4. **Granulometric composition of latex–mica mixed dispersions at pH 6.7**

Размер частиц, мкм	Массовое содержание частиц при концентрации латекса, %			
	0,05		0,1	
	концентрация ДФ, %			
	0,3	1,0	0,3	1,0
0–10	79,1	36,1	54,8	18,6
10–20	7,9	1,9	7,4	0,7
20–40	2,3	20,1	8,8	4,0
40–63	1,5	32,9	29,0	5,5
63–100	2,0	9,0	–	10,9
> 100	7,2	–	–	60,5

В работе было исследовано также влияние различных по химической природе ПАВ на диспергируемость данных порошков в кремнийорганическом латексе. Концентрация TiO_2 и слюды во всех последующих опытах составляла 0,5%. На рис. 3 представлены кривые изменения оптической плотности систем латекс–слюда–ПАВ с содержанием вводимого ПАВ (LCN или Оротан) 0,5 и 1% и латекса – 0,05 и 0,1%.

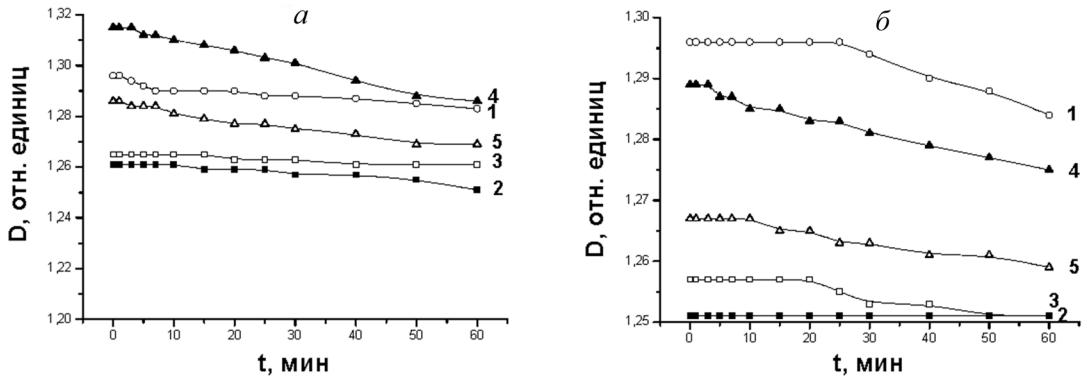


Рис. 3. Изменение оптической плотности (*D*) смешанных систем латекс–слюда–ПАВ во времени (*t*) с концентрацией латекса: *а* – 0,05%, *б* – 0,1%: *1* – латекс–слюда; смешанные системы латекс–слюда–ПАВ, %: *2* – LCN 0,5; *3* – LCN 1,0; *4* – Оротан 0,5; *5* – Оротан 1,0

Fig. 3. Change of latex-mica-surfactant mixed dispersion optical density (*D*) in time (*t*) with latex concentration: *а* – 0.05%; *б* – 0.1%: *1* – latex-mica; mixed latex-mica-surfactant systems, surfactant %: *2* – LCN 0.5; 3 – LCN 1.0; *4* – Orotan 0.5; *5* – Orotan 1.0

Из рис. 3 следует, что введение данных диспергаторов в систему латекс–слюда не оказывает заметного влияния на изменения в выбранном времени оптической плотности смешанных систем. Угол наклона кинетических кривых изменения *D* для всех случаев имеет примерно одинаковое значение при концентрации ДФ 0,5 %. Однако в сравнении с системами латекс–слюда введение диспергаторов способствует повышению диспергируемости слюды и образованию дисперсий, близких к монодисперсным с максимумом фракции частиц в диапазоне 10–20 мкм. В некоторых случаях содержание этой фракции достигает 94–99%. Дисперсии имеют близкий состав по размерам частиц, но все же неионогенный диспергатор LCN несколько менее эффективен при диспергировании слюды в метилфенилполисилоксановом латексе, чем анионный Оротан.

Таблица 5. **Гранулометрический состав смешанных дисперсий латекс–слюда–ПАВ при pH 6,7**

Table 5. **Granulometric composition of latex–mica–surfactant mixed dispersions at pH 6.7**

Размер частиц, мкм	Концентрация латекса, %							
	0,05				0,1			
	тип и содержание ПАВ, мас.%							
	анионный[1]		неионогенный[2]		анионный		неионогенный	
	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0
	Содержание фракции, %							
0–10	1,0	2,3	1,1	2,4	0,1	1,5	0,6	2,0
10–20	99,0	83,4	94,3	80,5	66,5	97,1	62,2	98,0
20–40	–	4,6	4,6	0,2	33,4	1,4	7,3	–
40–63	–	0,9	–	0,2	–	–	3,9	–
63–100	–	6,9	–	14,8	–	–	15,5	–
>100	–	1,8	–	1,9	–	–	0,4	–

Примечание. [1]Анионный ПАВ Оротан; [2]неионогенный – LCN.

Введение этих же диспергаторов в смешанную дисперсию латекс–TiO_2приводит к следующим зависимостям: анионный Оротан стабилизирует систему латекс–TiO_2–ПАВ, в то время как LCN является слабым стабилизатором (рис. 3, кривые *1*, *2*, *3*).

Данные гранулометрического анализа (табл. 6) и турбидиметрии (рис. 4) свидетельствуют о примерно одинаковом влиянии применяемых диспергаторов на эффективность диспергирования TiO_2 в этой среде, но в то же время и об очень слабом стабилизирующем действии неионогенного ПАВ. Следует отметить, что используемый при диспергировании неионогенный ПАВ приводит к повышенному пенообразованию, что крайне нежелательно для получения покрытий с защитными функциями.

На рис. 5 представлены кривые изменения оптической плотности систем латекс–TiO_2–ПАВ и латекс–слюда–ПАВ при более высоком pH дисперсионной среды 8,7.

Таблица 6. **Гранулометрический состав смешанных дисперсий латекс–TiO_2–ПАВ с концентрацией TiO_2 0,5% при pH 6,7**

Table 6. **Granulometric composition of latex–TiO_2–surfactant mixed dispersions containing 0.5% of TiO_2 at pH 6.7**

Размер частиц, мкм	Концентрация латекса, %							
	0,05				0,1			
	тип и содержание ПАВ, мас.%							
	анионный		неионогенный		анионный		неионогенный	
	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0
	Содержание фракции, %							
0–10	3,0	0,6	2,2	1,4	0,4	1,0	2,1	0,6
10–20	80,5	77,5	82,9	83,7	45,8	88,7	97,9	70,4
20–40	5,9	21,8	6,9	14,9	7,5	10,2	–	4,1
40–63	10,6	–	8,0	–	0,1	–	–	24,9
63–100	–	–	–	–	–	–	–	–
>100	–	–	–	–	46,1	–	–	–

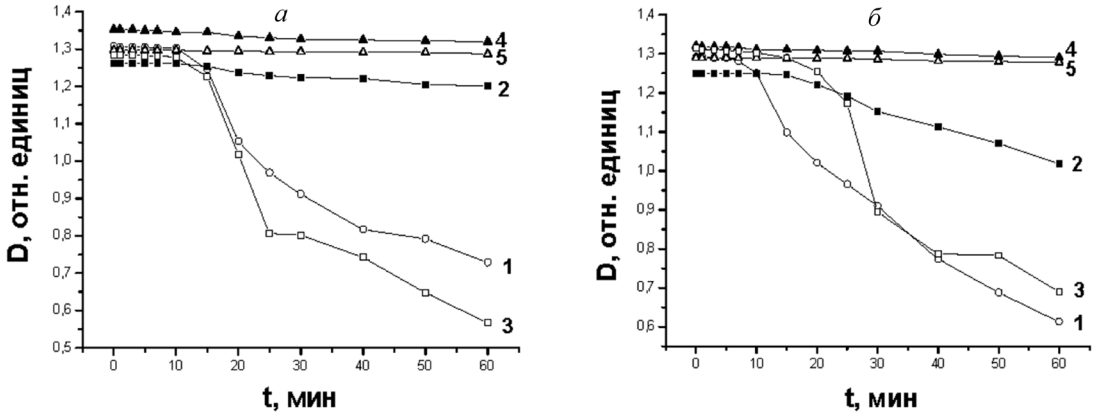


Рис. 4. Изменение оптической плотности (*D*) смешанных систем латекс–TiO_2–ПАВ от времени (*t*) с концентрацией латекса: *а* – 0,05%, *б* – 0,1%; *1* – латекс–TiO_2; смешанные системы латекс–TiO_2–ПАВ, %: *2* – LCN 0,5; *3* – LCN 1,0; *4* – Оротан 0,5; *5* – Оротан 1,0

Fig. 4. Change of latex–TiO_2–surfactant mixed dispersion optical density (*D*) in time (*t*) with latex concentration: *а* – 0,05%, *б* – 0,1%; *1* – latex–TiO_2; mixed latex–TiO_2–surfactant systems, surfactant %: *2* – LCN 0.5; *3* – LCN 1.0; *4* – Orotan 0.5; 5 – Orotan 1.0

Из сравнения рис. 5, *а* и 4, *а* следует, что смещение pH в щелочную область мало влияет на агрегативную устойчивость смешанных систем латекс–TiO_2–Оротан, что является несколько неожиданным. Так как из литературных данных известно, что повышение pH приводит к росту степени диссоциации кислотных групп адсорбированных анионных эмульгаторов, которые были использованы при получении латексов и поверхностных гидроксильных групп TiO_2 [6], это в свою очередь должно приводить к росту заряда как индивидуальных, так и композитных частиц и их дзета-потенциала и способствовать отталкиванию одноименно заряженных частиц.

С другой стороны, несколько повышается устойчивость (рис. 4, *а* и 5, *а*, кривая *3*) дисперсии латекс–TiO_2–LCN, хотя LCN неионогенный ПАВ и не подвержен влиянию pH. Повышение pH дисперсионной среды от 6,7 до 8,7 на систему латекс–слюда влияет в незначительной степени при введении в ее состав обоих типов диспергаторов (рис. 3, *а* и 5, *б*).

В табл. 7 приведены данные гранулометрического анализа систем латекс–TiO_2–ПАВ при pH 8,7, свидетельствующие о снижении фракции крупных агрегатов частиц по сравнению с системой, не содержащей и содержащей диспергатор, и существенным снижением полидисперсности смешанных дисперсий по сравнению со случаем, когда диспергирование TiO_2 в латексе проводилось при pH 6,7 (сравнить табл. 6, 7 и 5).

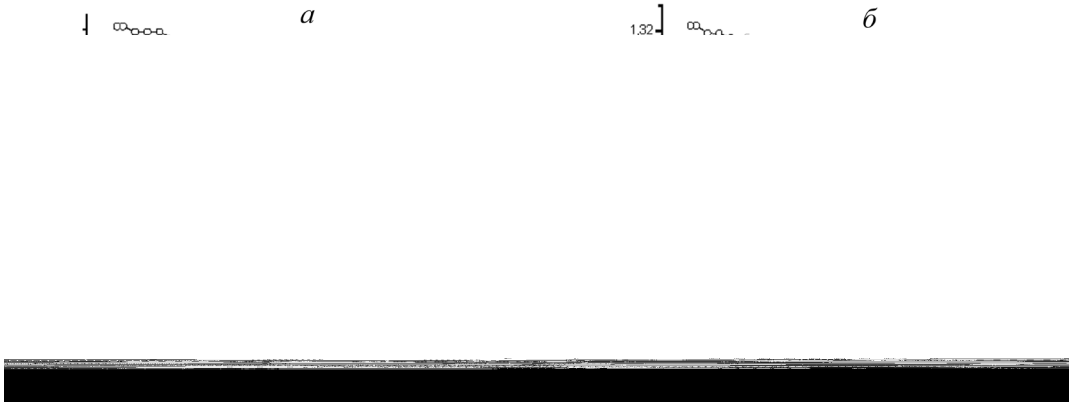


Рис. 5. Изменение оптической плотности (*D*) смешанных систем во времени (*t*) при pH ДС 8,7 с дисперсной фазой: *а* – TiO_2, *б* – слюда; *1* – латекс–TiO_2; смешанные системы латекс–пигмент–ПАВ: *2* – 0,5% LCN; *3* – 1,0% LCN; *4* – 0,5% Оротан; 5 – 1,0% Оротан. Концентрация латекса – 0,05%

Fig. 5. Change of mixed system optical density (*D*) in time (*t*) at pH 8.7 with disperse phase: *а* – TiO_2, *б* – mica; *1* – latex-TiO_2; mixed latex-pigment-surfactant systems: *2* – LCN 0.5%; *3* – LCN 1.0%; *4* – Orotan 0.5%; *5* – Orotan 1.0%

Таблица 7. **Гранулометрический состав дисперсий латекс–TiO_2–ПАВ при pH 8,7**

Table 7. **Granulometric composition of latex–TiO_2–surfactant dispersions at pH 8.7**

Размер частиц, мкм	Латекс–TiO_2	Тип и содержание ПАВ, мас.%			
		анионный		неионогенный	
		0,5	1,0	0,5	1,0
	Содержание фракции, %				
0–10	0,9	1,2	1,0	4,1	1,6
10–20	48,6	98,8	99,0	64,1	43,6
20–40	9,7	–	–	17,1	5,1
40–63	–	–	–	14,7	50,7
63–100	3,7	–	–	–	–
>100	37,1				

При введении неионогенного ПАВ диспергируемость TiO_2 при pH 8,7 ухудшается по сравнению с pH 6,7, что приводит к снижению содержания фракции размером 10–20 мкм. В системе латекс–слюда при pH 8,7, не содержащей ПАВ, происходит значительное улучшение диспергируемости слюды и образование монодисперсных суспензий с преимущественным размером частиц 10–20 мкм (98,3%) (табл. 8).

Таблица 8. **Гранулометрический состав дисперсий латекс–слюда–ПАВ при pH 8,7**

Table 8. **Granulometric composition of latex–mica–surfactant dispersions at pH 8.7**

Размер частиц, мкм	Латекс–слюда	Тип и содержание ПАВ, мас.%			
		анионный		неионогенный	
		0,5	1,0	0,5	1,0
	Содержание фракции, %				
0–10	1,5	1,6	0,2	0,2	0,2
10–20	98,3	77,5	86,3	82,5	48,9
20–40	0,2	0,4	13,5	17,3	17,1
40–63	–	3,5	–	–	11,4
63–100	–	1,4	–	–	0,7
>100	–	15,6	–	–	21,8

Характер влияния ПАВ на гранулометрический состав слюды остается таким же, как при pH 6,7. Таким образом, повышение pH дисперсионной среды от 6,7 до 8,7 заметно улучшает диспергируемость TiO_2 в присутствии анионного Оротана и слабо влияет на диспергируемость при введении неионогенного LCN.

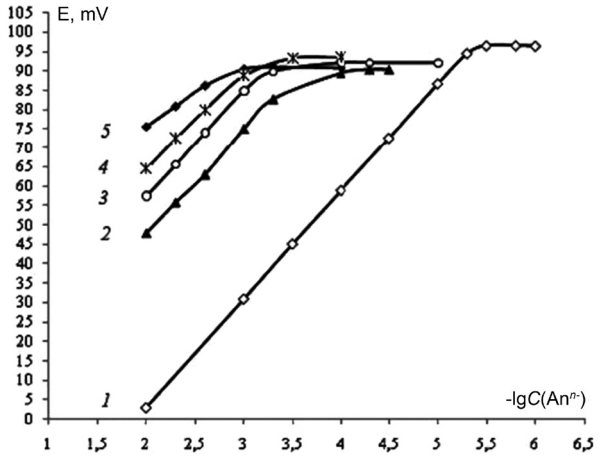


Рис. 2. Зависимости электродного потенциала MoO_4^{2-}– селективного электрода (*1*) (на основе ТМ, ДБФ и ГЭ) от концентрации оксалат- (*2*), сульфат- (*3*), вольфрамат- (*4*), хлорид-ионов (*5*)

Fig. 2. The relationship between concentrations of oxalate (*2*), sulphate (*3*), tungstate (*4*) and chloride (*5*) ions, and the electrode potential for MoO_4^{2-} selective electrode (*1*) (based on TM+dibutyl phthalate+HE)

На рис. 2 представлены зависимости электродного потенциала MoO_4^{2-} − СЭ (на основе ТМ с добавлением в состав мембран сольватирующей добавки − ГЭ) от концентрации мешающих ионов.

ГЭ образует с ЧАС в кислородсодержащих анионных формах прочные сольваты различного строения с высокими константами образования [13], что приводит к увеличению констант обмена этих анионов на более гидрофобные, например, хлориды и улучшению селективности MoO_4^{2-} – СЭ к потенциалопределяющим ионам MoO_4^{2-} в их присутствии.

В табл. 2 обобщены результаты по изучению аналитических характеристик MoO_4^{2-}–СЭ.

Таблица 2. **Характеристика MoO_4^{2-}–СЭ**

Table 2. **Characteristics of MoO_4^{2-} – selective electrode**

Мембрана	№1	№2	№3	№4
MoO_4^{2-}–СЭ				
Наклон, мВ/декаду	27	27,5	27,5	28
НПО, моль/л	$5\cdot10^{-5}$	$8\cdot10^{-6}$	$1\cdot10^{-5}$	$5\cdot10^{-6}$
Коэффициенты селективности $K^{\mathrm{Pot}}_{MoO_4^{2-},j}$				
Cl^-	1,5	$6\cdot10^{-3}$	0,4	$2\cdot10^{-3}$
SO_4^{2-}	$9\cdot10^{-2}$	$8{,}5\cdot10^{-3}$	$6\cdot10^{-2}$	$9\cdot10^{-3}$
$C_2O_4^{2-}$	0,55	0,15	0,9	$2\cdot10^{-2}$
WO_4^{2-}	0,2	$2{,}5\cdot10^{-2}$	$4{,}5\cdot10^{-2}$	$5\cdot10^{-3}$

Из предварительного эксперимента установлено, что потенциал MoO_4^{2-}–СЭ мало зависит от pH при значениях, превышающих 7,5−8,0. Соответствующие значения pH растворов поддерживали с помощью разбавленного раствора аммиака, однако так, чтобы они не превышали 8,0−8,5 для MoO_4^{2-}–СЭ. Высокие значения pH способствуют накоплению карбонатов, которые оказывают сильное мешающее влияние на потенциал электродов и ухудшают воспроизводимость результатов. Более низкие значения pH также недопустимы, так как способствуют гидролитическим и поликонденсационным процессам в растворах.

Со временем наклоны MoO_4^{2-}–СЭ, мембраны которых содержат ГЭ, снижаются примерно до 10−15 мВ/декаду, что соответствует наклону четырех- или шестизарядных ионов. Возможно образуются молибденсодержащие полиионы, которые накапливаются в мембране вследствие усиленной их сольватации ГЭ.

На рис. 3 представлены ИК-спектры кристаллического $Na_2MoO_4\cdot2H_2O$ и 0,1 моль/л растворов при различных pH.

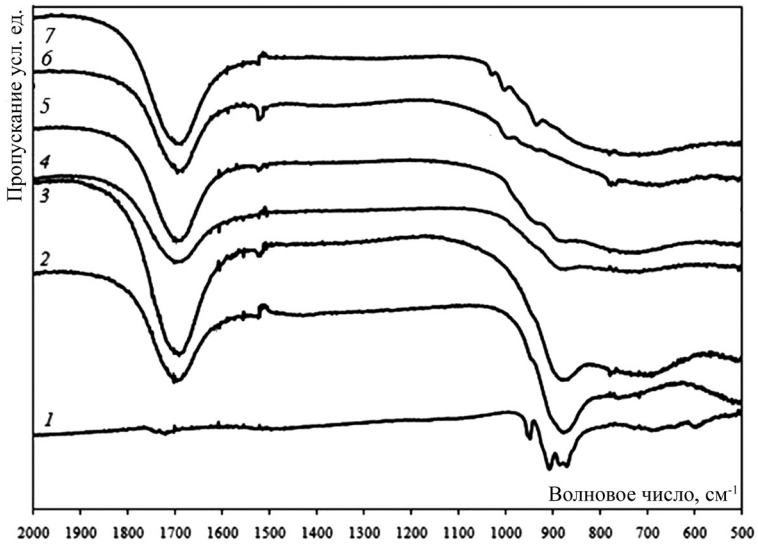


Рис. 3. ИК-спектры кристаллического $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (*1*) и 0,1 моль/л растворов при различных pH: *2* – 9,26, *3* – 7,70, *4* – 7,26, *5* – 6,93, *6* – 3,48, *7* – 2,16

Fig. 3. IR spectra of crystalline $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (*1*) and its 0.1 mol/L solutions at various pH: *2* – 9,26, *3* – 7,70, *4* – 7,26, *5* – 6,93, *6* – 3,48, *7* – 2,16

Для свежеприготовленных растворов при pH более 7,5 в ИК-спектрах (рис. 3) не зафиксировано полос, характерных для мостиковых колебаний Mo−O−Mo. При стоянии растворов с pH менее 7,5 происходит углубление гидролитических и конденсационных процессов, что заметно отражается на ИК-спектре (рис. 3, спектры 4–7), в котором появляются полосы валентных колебаний ν(Mo−O−Mo) около 885 $см^{-1}$, а также группа полос около 1030−985$см^{-1}$, относящаяся к деформационным колебаниям δ(Mo−OH) [14, 15].

Учитывая это обстоятельство, при разработке MoO_4^{2-}−СЭ используются только свежеприготовленные растворы, хранящиеся не более двух суток. При соблюдении этого условия удается получать более воспроизводимые результаты.

Выводы. Показано, что большая селективность и более низкие НПО проявляются для MoO_4^{2-} − СЭ на основе триметильной ЧАС с добавлением нейтрального переносчика гептилового эфира *п*-трифторацетилбензойной кислоты (мембрана №4), обладающей наибольшей стерической доступностью, что, видимо, связано с увеличением констант ассоциации ионов MoO_4^{2-} с катионами ЧАС. Введение сольватирующей добавки (ГЭ) приводит к увеличению селективности MoO_4^{2-} − СЭ к MoO_4^{2-} в присутствии мешающих вольфрамат-, хлорид-, сульфат-, оксалат-ионов.

Список использованных источников

1. Лурье, Ю. Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод / Ю. Ю. Лурье. – М.: Химия, 1984. – 448 с.

2. Сорбция комплекса пирокатехинового фиолетового с молибденом (VI) на аниоините АВ-17хВ / Ю. А. Барбалит [и др.] // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 1998. – Т. 39, № 3. – С. 174–177.

3. Бусев, А. И. Аналитическая химия молибдена / А. И. Бусев. – М.: Академия наук СССР, 1962. – 303 с.

4. Мохосоев, М. В. Состояние ионов молибдена и вольфрама в водных растворах / М. В. Мохосоев, Н. А. Шевцова. − Улан-Удэ: Бурятское книж. изд-во, 1977. − 168 с.

5. Сибиркин, А. А. Взаимное превращение изополисоединений молибдена(VI) в водном растворе / А. А. Сибиркин, О. А. Замятин, М. Ф. Чурбанов // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. − 2008. − № 5. − С. 45–51.

6. PVC membrane electrode based on triheptyl dodecyl ammonium iodide for the selective determination of molybdate(VI) / Jianguo Wang [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 589, N 1. – P. 33−38.

7. Membranes of 5,10,15,20-Tetrakis(4-Methoxyphenyl) Porphyrinatocobalt (TMOPP-Co) (I) as MoO_4^{2-} − Selective Sensors / V. K. Gupta [et al.] // Sensors. – 2002. – Vol. 2, N 5. – P. 164–173.

8. Molybdate Anion Recognition through a Cationic Crowned IonoporeBased Electrochemical Sensor: Detection of an Environmental Pollutant / B. Sethi [et al.] // Int. J. Env. Sci. − 2011. − Vol. 1, N 6. − P. 1361−1372.

9. Khodakarami, H. PVC-Based Cerium Phosphate Membrane Exhibiting Selectivity for Molybdate Anions / H. Khodakarami, H. O. Ghourchian // Iran. J. Chem.&Chem. Eng. – 2000. – Vol. 19, N 2. – P. 51–55.

10. Камман, К. Работа с ионоселективными электродами / К. Камман. – М.: Мир, 1980. – 288 с.

11. Морф Вернер Е. Принципы работы ионоселективных электродов и мембранный транспорт / Морф Вернер Е. – М.: Мир, 1985. – 280 с.

12. Способ проведения инфракрасной спектроскопии твердофазных и/или жидких, и/или вязких, и/или газообразных веществ: пат. BY (11) 11876 (13) C1 / Л. П. Максе, А. В. Томов, П. И. Марков // Афіц. бюл. – 2009. – № 2 (67). – С. 111.

13. Новый сульфатселективный электрод и его применение в анализе / В. В. Егоров [и др.] // Журн. аналит. химии. − 2006. – Т. 61, № 4. – С. 416–422.

14. Базарова, Ц. Т. Колебательные спектры тройных молибдатов таллия, двухвалентных металлов и циркония / Ц. Т. Базарова, А. Е. Сарапулова, Б. Г. Базаров // Вестн. Бурят. гос. ун-та. – 2011. – № 3. – С. 3–7.

15. Накамото К. ИК-спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений / К. Накамото. − М.: Мир, 1991. – 536 с.

References

1. Lur'e, Yu.Yu., *Analiticheskaya khimiya promyshlennykh stochnykh vod* [Analytical chemistry of industrial waste water], Khimiya, Moscow, RU, 1984.

2. Barbalat Yu.A., Ivanov V.M., Polenova T.V. and Fedorova N.V., ″Sorption of a molybdenum (VI) Pyrocatechol Violet complex on the AV-17-xV anion exchanger″, *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2: Khimiya* [Proceedings of the Moscow State University, Series 2. Chemistry], 1998, vol. 39, no. 3, pp. 174−177.

3. Busev, A.I. *Analiticheskaya khimiya molibdena* [Analytical chemistry of molybdenum], Akademiya nauk SSSR, Moscow, RU, 1962.

4. Mokhosoev M.V. and Shevtsova N.A., *Sostoyanie ionov molibdena i vol'frama v vodnykh rastvorakh* [The state of molybdenum and tungsten ions in aqueous solutions], Buryatskoe knizhnoe izdatel'stvo, Ulan-Ude, RU, 1977.

5. Sibirkin A.A., Zamyatin O.A. and Churbanov M.F., ″Interconversions of molybdenum(VI) isopolycompounds in aqueous solutions″, *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* [Proceedings of the Nizhny Novgorod University named after N.I. Lobachevsky], 2008, no. 5, pp. 45–51.

6. Jianguo Wang, Lingling Wang, Yinghui Han, Jianbo Jia, Lili Jiang, Weiwei Yang, Qiaohua Sun and Hui Lv., ″PVC membrane electrode based on triheptyl dodecyl ammonium iodide for the selective determination of molybdate (VI)″, *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 589, no. 1, pp. 33–38.

7. Gupta Vinod K., Chandra S., Chauhan D. K. and Mangla R., ″Membranes of 5,10,15,20-Tetrakis (4-Methoxyphenyl) Porphyrinatocobalt (TMOPP-Co) (I) as MoO_4^{2-}− Selective Sensors″, *Sensors*, 2002, vol. 2, no. 5, pp. 164−173.

8. Sethi B., Kumar S., Singh R., Gupta V.K. and Singh L.P., ″Molybdate Anion Recognition through a Cationic Crowned Ionopore Based Electrochemical Sensor: Detection of an Environmental Pollutant″, *International Journal of Environmental and Science Education*, 2011, vol. 1, no. 6, pp. 1361−1372.

9. Khodakarami H. and Ghourchian H.O., ″PVC-Based Cerium Phosphate Membrane Exhibiting Selectivity for Molybdate Anions″, *Iranian Journal Of Chemistry and Chemical Engineering*, 2000, vol. 19, no. 2, pp. 51−55.

10. Kamman K., *Rabota s ionoselektivnymi elektrodami* [Working with ion-selective electrodes], Mir, Moscow, RU, 1980.

11. Morf Verner E., *Printsipy raboty ionoselektivnykh elektrodov i membrannyi transport* [Principles of ion-selective electrodes and membrane transport], Mir, Moscow, RU, 1985.

12. Makse L.P., Tomov A.V. and Markov P.I., UO ″Mogilevskii gosudarstvennyi universitet imeni A. A. Kuleshova″, *Sposob provedeniya infrakrasnoi spektroskopii tverdofaznykh i/ili zhidkikh i/ili vyazkikh i/ili gazoobraznykh veshchestv* [A method of solid-phase infrared spectroscopy and/or liquid and/or viscous and/or gaseous substances], Baza patentov Belarusi, BY, Pat. 11876.

13. Egorov V.V., Nazarov V.A., Okaev E.B. and Pavlova T.E., ″New sulfatselektivny electrode and its application in the analysis″, *Journal of Analytical Chemistry*, 2006, vol. 61, no. 4, pp. 416−422.

14. Bazarov Ts.T., Sarapulova A.E. and Bazarov B.G., ″Vibrational spectra of ternary molybdates thallium, divalent metals and zirconium″, *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta* [Bulletin of the Buryat State University], 2011, no. 3, pp. 3–7.

15. Nakamoto K., *IK-spektry i spektry KR neorganicheskikh i koordinatsionnykh soedinenii* [Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds], Mir, Moscow, RU, 1991.

Информация об авторах

Рахманько Евгений Михайлович – д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой аналит. химии, Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь).

Матвейчук Юлия Владимировна – канд. хим. наук, доцент кафедры химии, Могилевский государственный университет продовольствия (просп. Шмидта, 3, 212027, Могилев, Республика Беларусь). E-mail: Yu_Matveychuk @mail.ru.

Information about the autors

Rakh'manko Evgenii Mikhailovich – D. Sc. (Chemistr)y, Professor, Head of the Department of Analytical Chemistry, Belarusian State University, (14 Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus).

Matveichuk Yulya Vladimirovna – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Chemistry Department of Mogilev State University of Food Technologies (3 Shmidta Ave., 21202, Mogilev, Republic of Belarus). E-mail: Yu_Matveychuk@ mail.ru.

Копырин Артем Дмитриевич – магистрант кафедры аналит. химии, Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Artikop@inbox.lv.

Потапкин Никита Владимирович – студент 5-го курса кафедры аналит. химии, Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь).

Для цитирования

Молибдат-селективный электрод на основе высших четвертичных аммониевых солей / Е. М. Рахманько [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 44–50.

Kopyrin Artyom Dmitrievich – Master of the Department of analytical chemistry, Belarusian State University. (14 Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Artikop@inbox.lv.

Potapkin Nikita Vladimirovich – Student of the 5th year of the department of analytical chemistry, Belarusian State Universit (14 Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus).

For citation

Rakhman'ko E. M., Matveichuk Yu. V., Kopyrin A. D., Potapkin N. V**.** Molybdate selective electrode based on higher quaternary ammonium salts. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 44–50. (In Russian).

ISSN 0002-3590(print.)
УДК 543.054

Поступила в редакцию 11.07.2016
Received 11.07.2016

М. Ф. Заяц

Институт защиты растений, а/г Прилуки, Минский р-н, Республика Беларусь

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ЗЕРНЕ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

На основе экспериментальных данных разработана и валидирована методика совместного определения остаточных количеств 69 пестицидов различных классов (амиды, анилинопиримидины, динитроанилины, имидазолы, карбаматы, карбанилаты, морфолины, неоникотиноиды, органодитиофосфаты, органотиофосфаты, пиретроиды, симмтриазины, сложные эфиры, стробилурины, тиокарбаматы, триазолы и др.) в зерне озимой пшеницы методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Экстракционная методика пробоподготовки отличается простотой исполнения, малым расходом реактивов, экспрессностью и обеспечивает чистоту экстрактов, достаточную для получения воспроизводимых количественных результатов, как минимум, при 200 анализах. Степени извлечения определяемых веществ из зерна озимой пшеницы при уровнях добавок 10,0, 20,0 и 200 мкг·кг$^{-1}$ составляли 76–118 % при стандартных отклонениях определения не превышающих 9 %. Пределы обнаружения для всех исследованных пестицидов не превосходили 0,01 мг·кг$^{-1}$. Пределы количественного определения пестицидов не превышали максимально допустимых уровней (МДУ) содержания остаточных количеств пестицидов в зерне хлебных злаков, установленных в Беларуси и Европейском союзе. Площади пиков веществ в диапазоне концентрации от 50 до 3000 мкг·л$^{-1}$ линейно зависели от их концентрации в растворах. Значения коэффициентов детерминации при этом R^2 превышали 0,997. Разработанная методика была успешно использована для анализа зерна зерновых культур на остаточные количества пестицидов, проходивших регистрационные испытания в Беларуси в 2015 году.

Ключевые слова: экстракционная пробоподготовка, определение остаточных количеств пестицидов, разработка методики, валидация методики, газовая хроматография, зерно озимой пшеницы.

M. F. Zayats

Institute of Plant Protection, a/c Priluki, Minsk district, Republic of Belarus

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR CO-DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN WINTER WHEAT GRAIN BY GAS CHROMATOGRAPHY WITH MASS SPECTROMETRIC DETECTION

Method for determination of 69 pesticides from different classes (amides, anilinopyrimidines, dinitroanilines, imidazoles, carbamates, carbanilates, morpholines, neonicotinoids, organodithiophosphates, organothiophosphates, pyrethroids, simmtriazines, esters, strobilurins, thiocarbamates, triazoles, etc.) in winter wheat grain by gas chromatography with mass spectrometric detection has been developed and validated by experimental data. The developed extraction method of sample preparation is simple, quick, consumes only cheap and rather common reagents and provides extracts clean enough to obtain reproducible quantitative results without cleaning of injector liner at least for 200 injections. The recovery values of studied pesticides from winter wheat grain were between 76 and 118 % with RSD values below 9 % at 10.0, 20.0 and 200 μg·kg^{-1} spiking levels. Detection limits were less or equal to 0.01 mg·kg^{-1} for all the studied pesticides. The obtained limits of quantification were below or equal to the maximum residue levels (MRLs) which are set by Belarus and the European Union for the corresponding pesticides in cereal grains. The linear range used in the calibration curves was from 50 to 3000 μg·L^{-1} with the values of the determination coefficients R^2 more than 0.997. The developed method was successfully used for the analysis of cereal grains for the residues of the pesticides, which were under registration trials held in Belarus in 2015.

Keywords: sample preparation, pesticide residue analysis, method development, method validation, gas chromatography, winter wheat grain.

Введение. Современные подходы при культивации зерновых культур обычно предполагают применение комплекса химических средств защиты растений [1], содержащих ряд веществ, которые необходимо контролировать в получаемой продукции [2, 3]. К настоящему времени известны десятки методик определения остаточных количеств пестицидов в зерне зерновых культур [4–18]. Имеются методики определения как отдельных веществ [4–9], так и групповые методики,

© Заяц М. Ф., 2017

позволяющие одновременно определять от двух или нескольких соединений до нескольких десятков и даже сотен пестицидов [10–18], относящихся к разным химическим классам. Очевидно, что при необходимости контролировать несколько веществ в анализируемой продукции, использование методик совместного определения пестицидов позволяет значительно сократить время, необходимое на подготовку проб и хроматографический анализ, а также снизить расход реактивов и себестоимость проведения анализа.

Следует отметить определенные успехи в разработке методик совместного определения остаточных количеств пестицидов (ОКП) в зерне хлебных злаков. Появление высокоэффективных хроматографических приборов, оснащенных высокопроизводительными и высокоселективными детекторами, одновременно с усовершенствованием методов компьютерных расчетов большого массива данных приводит к попыткам создания универсальных методик, позволяющих проводить одновременное определение максимально возможного количества пестицидов с сильно различающимися физико-химическими свойствами. В то же время расширение круга определяемых веществ часто приводит к снижению степени очистки получаемых на стадии извлечения экстрактов от матричных компонентов. В свою очередь наличие значительного количества коэкстрактивных веществ в анализируемой пробе может оказывать значительное влияние на сорбционные и распределительные свойства хроматографической колонки, ее емкость. Это может приводить к смещению времени выхода аналитов, размыванию соответствующих им пиков на хроматограмме и, как следствие, к ложноположительным и ложноотрицательным результатам при идентификации соединений, не говоря уже о корректных количественных расчетах [19].

Подавляющее большинство известных на сегодняшний момент методик пробоподготовки заключается в экстракции (от 1 до 3-кратной) пестицидов из образцов измельченного зерна ацетонитрилом [4], ацетоном [5, 6, 18], водными растворами ацетонитрила [7, 10–14, 17, 18] или ацетона [8, 9], смесью ацетона и метанола [15, 16], этилацетатом [18]. Иногда в методах присутствует добавление на стадии извлечения из зерна ацетонитрилом неорганических и органических солей (гидроцитрата натрия, цитрата натрия, ацетата натрия, безводного $MgSO_4$, NaCl) [10–14, 17, 18].

Чаще всего при этом экстракты образцов содержат большое количество матричных компонентов, препятствующих их непосредственному инструментальному анализу. Для очистки экстрактов используют метод жидкостной экстракции, а также очистку на колонках или картриджах с силикагелем, флоризилом, оксидом алюминия, активированным углем [4–9, 15, 16]. Применяют также очистку методом дисперсионной твердофазной экстракции, используя такие сорбенты, как графитизированная сажа, многослойные углеродные нанотрубки, а также C18 и PSA, представляющие собой силикагель с привитыми соответственно октадеканоильными и аминоэтилиминопропильными радикалами [10–14, 17, 18].

Следует отметить, что методики, позволяющие получить достаточно чистые образцы для возможности анализа на относительно дешевом и доступном оборудовании, обычно трудоемки, длительны и дорогостоящи в пробоподготовке, а также предназначены для определения отдельных веществ в отдельных матрицах [4–9].

Относительно дешевые экспрессные методики, направленные на совместное определение нескольких десятков пестицидов, часто не позволяют получить чистые образцы и предполагают использование дорогостоящего оборудования (ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС) [10–14, 17, 18].

Таким образом, актуальной остается проблема разработки дешевых, экспрессных, селективных методик подготовки проб, позволяющих проводить достоверное определение микроколичеств пестицидов при их совместном присутствии в зерне злаковых культур на относительно дешевом газохроматографическом оборудовании. Целью настоящей работы также является валидация разработанной методики и апробация на реальных образцах.

Реактивы, растворы, материалы. В работе использовалось 69 аналитических стандартов действующих веществ (д. в.) пестицидов (табл. 1). Содержание действующих веществ пестицидов в аналитических стандартах составляло от 70,4 % (для пропамокарба гидрохлорида) до 96,4 – 100 % (для остальных 68 стандартов).

Маточные растворы пестицидов с концентрацией 100 мкг·мл$^{-1}$ готовили растворением 0,01000 г препарата, содержащего 100,0 % д. в., в ацетонитриле или ацетоне в мерной колбе на 100 мл. При меньшем содержании д. в. пестицида в аналитическом стандарте делали соответствующие пересчеты. Маточный раствор смеси пестицидов, содержащий 69 пестицидов (табл. 1), с концентрацией 20 мкг·мл$^{-1}$ каждого пестицида в ацетоне готовили из маточных растворов индивидуальных веществ с концентрацией 100 мг·л$^{-1}$.

Таблица 1. **Времена удерживания (ВУ) веществ, ионы, использовавшиеся при количественном определении (колич. ион) и идентификации (идентифик. ионы) пестицидов при анализе методом ГХ-МС в режиме мониторинга выбранных ионов; значения коэффициентов *K* линейной зависимости площади пиков веществ от их концентрации в растворах, а также соответствующие коэффициенты детерминации R^2**

Table 1. **Retention times (RT) of substances; ions used for the quantitative determination (quant. ion) and identification (ident. ions) of pesticides at GC-MS analysis in selected ion monitoring (SIM) mode; the values of the coefficients *K* of the linear dependence of the area of the peaks of substances on their concentration in solutions, as well as the corresponding coefficients of determination R_2**

Вещество	ВУ	Колич. ион	Идентифик. ионы (интенсивность, %)		*K*	R^2
			1	2		
2,4-Д 2-этил-гексиловый эфир	17,54	220	222(65)	332(27)	$7{,}61\cdot10^4$	0,9999
Азоксистробин	31,96	344	345(41)	388(29)	$9{,}20\cdot10^4$	0,9992
Биксафен	28,46	159	413(6)	160(7)	$3{,}53\cdot10^5$	0,9997
Бифентрин	21,55	181	166(37)	165(26)	$3{,}77\cdot10^5$	0,9972
Боскалид	27,61	140	112(35,3)	142(31)	$2{,}07\cdot10^5$	0,9999
Галоксифоп-П-метил	16,06	316	288(97)	375(61)	$8{,}04\cdot10^4$	0,9999
Гамма-цигалотрин	23,31	181	197(60)	208(38)	$2{,}61\cdot10^4$	0,9981
Диазинон	11,24	179	137(97)	152(65)	$2{,}53\cdot10^5$	0,9999
Диметахлор	12,67	134	197(41)	210(11)	$2{,}49\cdot10^5$	0,9999
Диметенамид	12,64	154	230(34)	203(19)	$2{,}32\cdot10^5$	1,0000
Диметоат	11,13	87	93(43)	125(501)	$5{,}08\cdot10^4$	0,9992
Димоксистробин	21,69	116	205(43)	117(17)	$3{,}08\cdot10^5$	0,9999
Дифеноконазол	30,49	323	265(120)	267(77)	$1{,}03\cdot10^5$	0,9995
Дифлюфеникан	20,82	266	394(15)	267(17)	$3{,}07\cdot10^5$	0,9998
Имазалил	17,52	215	173(83)	217(64)	$4{,}33\cdot10^4$	0,9993
Квизалофоп-П-тефурил	40,59	285	71(135)	299(38)	$4{,}99\cdot10^4$	0,9992
Квизалофоп-П-этил	27,47	299	372(65)	163(67)	$8{,}03\cdot10^4$	0,9999
Клоквинтосетмексил	22,09	193	192(758)	194(240)	$4{,}28\cdot10^4$	0,9999
Кломазон	11,13	204	125(159)	127(50)	$1{,}54\cdot10^5$	0,9999
Крезоксим-метил	17,62	206	116(241)	131(129)	$7{,}21\cdot10^4$	0,9988
Ленацил	21,05	153	154(8)	110(8)	$4{,}04\cdot10^5$	0,9999
Малатион	13,82	173	127(103)	125(105)	$3{,}39\cdot10^4$	0,9999
Металаксил	13,16	160	206(105)	146(75)	$5{,}22\cdot10^4$	0,9999
Метрафенон	24,42	395	379(100)	393(101)	$4{,}75\cdot10^4$	0,9998
Мефенпир-диэтил	21,20	253	255(67)	299(32)	$1{,}27\cdot10^5$	0,9999
Паклобутразол	16,83	236	125(105)	167(42)	$1{,}21\cdot10^5$	0,9999
Пендиметалин	15,17	252	162(30)	191(19)	$1{,}08\cdot10^5$	0,9998
Пенконазол	15,60	248	159(137)	161(83)	$1{,}50\cdot10^5$	0,9996
Пентиопирад	18,96	177	152(24)	302(24)	$2{,}78\cdot10^5$	0,9997
Пенфлуфен	19,23	141	274(18)	317(7)	$4{,}84\cdot10^5$	1,0000
Пикоксистробин	16,54	145	335(27)	173(31)	$1{,}85\cdot10^5$	0,9999
Пириметанил	11,81	198	199(45)	77(11)	$3{,}11\cdot10^5$	0,9999
Пиримифос-метил	13,43	290	276(85)	305(66)	$9{,}19\cdot10^4$	0,9999
Проквиназид	20,83	288	330(33)	245(37)	$1{,}43\cdot10^5$	0,9999
Прометрин	13,41	241	184(113)	226(65)	$1{,}18\cdot10^5$	0,9997
Пропамокарб	7,54	58	129(4)	188 (3)	$5{,}09\cdot10^5$	0,9997
Пропиконазол	20,05; 20,26	259	261(65)	191(48)	$3{,}88\cdot10^4$	0,9998
Просульфокарб	13,40	128	91(97)	86(76)	$2{,}65\cdot10^5$	0,9998
Протиоконазол-дестио	18,26	186	188(33)	125(28)	$1{,}59\cdot10^5$	0,9997

Окончание табл. 1

Вещество	ВУ	Колич. ион	Идентифик. ионы (интенсивность, %)		*K*	R^2
			1	2		
Прохлораз	26,01	308	70(389)	180(278)	$1{,}62 \cdot 10^4$	0,9995
Спироксамин	12,59; 13,34	100	72(8)	101(6)	$3{,}39 \cdot 10^5$	0,9998
Тебуконазол	21,10	250	125(169)	252(33)	$8{,}11 \cdot 10^4$	0,9999
Тебуфенпирад	22,35	318	171(179)	333(76)	$1{,}36 \cdot 10^5$	0,9999
Тербутилазин	11,57	214	173(49)	216(35)	$1{,}07 \cdot 10^5$	0,9998
Тетраконазол	14,76	336	338(34)	171(23)	$1{,}46 \cdot 10^5$	0,9998
Тефлутрин	11,44	177	197(24)	141(13)	$3{,}27 \cdot 10^5$	0,9998
Тиаметоксам	15,49	212	182(92)	132(407)	$3{,}50 \cdot 10^4$	0,9999
Триадимефон	14,60	208	181(41)	210(30)	$1{,}13 \cdot 10^5$	0,9997
Тритиконазол	23,59	235	83(119)	217(50)	$7{,}02 \cdot 10^4$	0,9998
Фенбуконазол	26,92	198	129(265)	125(78)	$9{,}93 \cdot 10^4$	0,9995
Феноксапроп-П-этил	24,87	288	361(54)	290(34)	$1{,}62 \cdot 10^5$	0,9995
Феноксикарб	22,22	88	116(109)	186(23)	$2{,}08 \cdot 10^5$	0,9984
Фенпропидин	13,28	98	99(8)	273(2)	$1{,}06 \cdot 10^6$	0,9998
Фенпропиморф	14,01	128	129(8)	70(6)	$6{,}82 \cdot 10^5$	0,9998
Флуазифоп-П-бутил	18,06	282	254(52)	383(32)	$2{,}47 \cdot 10^5$	0,9999
Флуквинконазол	25,99	340	342(35)	108(46)	$9{,}13 \cdot 10^4$	0,9994
Флуксапироксад	22,21	159	381(11)	160(7)	$4{,}21 \cdot 10^5$	0,9999
Флуопиколид	20,49	209	347(47)	349(31)	$1{,}51 \cdot 10^5$	0,9999
Флуопирам	15,68	173	223(36)	145(43)	$1{,}49 \cdot 10^5$	0,9993
Флуроксипир-мептил	20,70	209	181(111)	254(40)	$2{,}94 \cdot 10^4$	0,9999
Флурохлоридон	15,13	311	174(162)	187(146)	$2{,}78 \cdot 10^4$	0,9998
Флуртамон	23,60	120	333(24)	199(27)	$1{,}71 \cdot 10^5$	0,9999
Флусилазол	17,92	233	206(38)	234(20)	$2{,}26 \cdot 10^5$	0,9997
Флуфенацет	14,41	211	151(228)	123(135)	$1{,}93 \cdot 10^4$	0,9995
Хлорпрофам	10,13	127	213(36)	129(31)	$1{,}76 \cdot 10^5$	0,9999
Хропирифос-метил	12,84	286	125(72)	288(68)	$6{,}11 \cdot 10^4$	0,9991
Ципродинил	15,43	224	225(62)	210(13)	$3{,}59 \cdot 10^5$	0,9999
Ципроконазол	18,67	222	139(77)	83(60)	$1{,}17 \cdot 10^5$	0,9996
Эпоксиконазол	21,43	192	165(42)	138(39)	$1{,}25 \cdot 10^5$	0,9989

Рабочие растворы смеси пестицидов с концентрацией 0,0500; 0,100; 0,200; 0,500; 2,00; 3,00 мг·л$^{-1}$ для построения градуировочного графика готовили из маточного раствора смеси пестицидов с концентрацией 20 мг·л$^{-1}$ на экстрактах контрольных образцов анализируемой матрицы, не содержащей определяемых веществ.

В качестве реактивов использовали также ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ; ацетон и калий углекислый, ч. д. а.; натрий хлористый, х. ч. Воду деионизованную, тип 3 получали на системе подготовки воды Direct-Q 3 UV System (Millipore).

В качестве контрольных образцов использовали образцы зерна озимой пшеницы, не содержащие остаточных количеств определяемых пестицидов. Образцы зерна с определенным содержанием пестицидов готовились добавкой к контрольным образцам зерна известного количества смеси стандартов пестицидов. При изучении степени извлечения пестицидов в модельных матрицах использовали маточный раствор смеси пестицидов с концентрацией 20 мг·л$^{-1}$.

Приборы, аппаратура, посуда. Определение концентраций пестицидов в анализируемых растворах осуществляли на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором GCMS-QP2010 Ultra, оснащенным автоинжектором AOC-20i, автосамплером AOC-20s (фирма Shimadzu, Киото, Япония) и ИПТ (испарителем с программируемой температурой) OPTIC-4 (фирма ATAS GL International B. V., Эйндховен, Нидерланды). Управление инструментами проводили при помощи программного обеспечения GCMS solution и Evolution Workstation для OPTIC-4. Инжектор оснащен стеклянным лайнером диаметром 3 мм с фриттой из пористого стекла на высоте 15 мм. Применяли кварцевую хроматографическую колонку длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и нанесенной неподвижной фазой SLB-5ms (фирма Supelco Analytical, Белле-

фонте, США) толщиной 0,25 мкм. В качестве газа-носителя использовали гелий газообразный марки «6.0» (99,9999%).

Разработка методики пробоподготовки. Разработка методики пробоподготовки зерна озимой пшеницы для определения остаточных количеств пестицидов сводилась к модификации известной методики QuEChERS [10–12, 14] с целью удешевления процедуры за счет использования более дешевых реактивов. Была введена также процедура концентрирования экстрактов, полученных из образцов зерна, путем упаривания на роторном вакуумном испарителе для возможности определения микроколичеств пестицидов в зерне на уровне ниже максимально допустимого.

Ввиду дороговизны безводного сульфата магния и сорбента PSA (привитой к силикагелю аминоэтилиминопропильной фазы), а также недостаточной эффективности ацетата и цитрата натрия, используемых в методике QuEChERS [10–12, 14] для обезвоживания ацетонитрильных экстрактов и их очистки от остаточного содержания высших карбоновых кислот, было предложено заменить их на карбонат калия. Помимо низкой стоимости, K_2CO_3 является более сильным высаливателем и водоотнимающим средством, чем $MgSO_4$. Карбонат калия намного дешевле PSA, ацетата и цитрата натрия, а также превосходит их по способности очистки ацетонитрильных экстрактов от высших карбоновых кислот.

Следует заметить, что использование карбоната калия позволяет не только снизить себестоимость процедуры пробоподготовки, но и исключить дополнительно используемую в QuEChERS стадию очистки экстрактов с помощью сорбентов в присутствии безводного сульфата магния. В случае когда чувствительности используемого хроматографического оборудования не достаточно для определения пестицидов на регламентируемом уровне, экстракты можно сконцентрировать упариванием.

Описание метода определения экстракции пестицидов. Образец измельченного зерна массой 10 г помещали в центрифужную пробирку на 50 мл. Затем добавляли 10 мл воды, 25 мл ацетонитрила, закрывали пробирку завинчивающейся крышкой и интенсивно встряхивали 4 мин. Затем добавляли 10 г NaCl, 0,5 г K_2CO_3 и встряхивали еще 2 мин. Пробирки центрифугировали при 3000 об./мин в течение 3 мин. Отбирали 20 мл верхнего ацетонитрильного слоя и переносили в остродонную колбу на 50 мл. Ацетонитрил упаривали до ~ 0,3 мл на роторном вакуумном испарителе при температуре 40 °С и выдували досуха в токе воздуха.

Сухой остаток в остродонной колбе растворяли в 1,00 мл ацетона. Ацетоновый раствор отбирали медицинским шприцем на 2 мл, фильтровали в виалу на 1,5 мл через тефлоновый фильтр с диаметром пор 0,20 мкм и анализировали методом ГХ-МС.

Условия хроматографирования. Пробу объемом 2 мкл вводили в ИПТ инжектор в режиме выдува растворителя. После ввода пробы растворитель выдували при 80 °С в течение 0,5 мин при коэффициенте деления потока, равном 40. После этого клапан делителя потока закрывали и образец переносили из лайнера в хроматографическую колонку поднятием температуры до 300 °С при скорости 200 °С·мин$^{-1}$. Время переноса образца составляло 4,0 мин, после чего делитель потока открывали при коэффициенте, равном 10.

Поток газа носителя (гелий газообразный марки «6.0») поддерживали при постоянной линейной скорости (35 см·с$^{-1}$). Температуру термостата колонки поддерживали при 50 °С в течение 1,5 мин после ввода пробы. Затем поднимали до 180 °С при скорости 30 °С мин$^{-1}$, далее до 285 °С при скорости 5 °С· мин$^{-1}$. После этого температура была постоянной в течение 18, 17 мин. Линия передачи в масс-спектрометр находилась при 290 °С. Масс-спектрометрию осуществляли в режиме ионизации электронным ударом (энергия электронов составляла 70 эВ) при температуре ионного источника 250 °С. Данные получали в режиме мониторинга выбранных ионов (SIM) после отсечки растворителя с 6,0 до 45,0 мин. Для идентификации веществ и количественных расчетов использовали три иона. Ионы, выбранные для идентификации веществ и количественных расчетов, а также относительные интенсивности ионов и время удерживания веществ, приведены в табл. 1. Относительная интенсивность иона, по которому проводили количественные расчеты, была принята за 100 %. Для управления оборудованием и обработки результатов использовали программное обеспечение GCMS solution (фирма Shimadzu, Киото, Япония).

Метрологическая характеристика метода. Линейность устанавливали по зависимости сигнала детектора от концентрации пестицидов в стандартных растворах при уровнях концентрации 0,0500; 0,100; 0,200; 0,500; 2,00; 3,00 мкг·мл$^{-1}$ и объеме вводимой пробы 2 мкл в трехкратной повторности. Было установлено, что в диапазоне концентрации от 0,0500 до 3,00 мкг·мл$^{-1}$ площади пиков веществ (S) линейно зависели от их концентрации в растворах (C, мкг·мл$^{-1}$) и выражались уравнением: $S = KC$. Значения коэффициентов K в данном уравнении, а также коэффициенты детерминации R^2 приведены в табл. 1. Как видно из представленных данных, коэффициенты детерминации градуировочных зависимостей R^2 превышают 0,9972, что удовлетворяют критерию линейности.

Для определения точности (степени извлечения пестицидов) и прецизионности (стандартного отклонения определения) метода были проанализированы 2 контрольных образца зерна озимой пшеницы и по 5 образцов с добавкой известного количества смеси пестицидов при 3 различных уровнях добавок (0,0100, 0,0200, 0,200 мг·кг$^{-1}$). Результаты определения пестицидов при разных уровнях добавок представлены в табл. 2. Пределы обнаружения для всех исследованных пестицидов не превышали 0,01 мг·кг$^{-1}$. Пределы количественного определения пестицидов находились до максимально допустимых уровней (МДУ) содержания остаточных количеств пестицидов в зерне хлебных злаков, установленных в Республике Беларусь [2] и Европейском союзе [3]. Сигнал детектора в контрольных образцах на времени выхода определяемых пестицидов не превышал 30% уровня сигнала детектора, соответствующего пределу определения (<0,003 мг·кг$^{-1}$).

Таблица 2. **Средние значения степеней извлечения пестицидов из образцов зерна озимой пшеницы при уровнях добавок 0,0100; 0,0200 и 0,200 мг·кг$^{-1}$ (<Извл>), стандартные отклонения степеней извлечения (СО) при $P = 0,95$ и $n = 5$, а также максимально допустимые уровни (МДУ) содержания пестицидов в зерне хлебных злаков**

Table 2. **Average recovery values of pesticides from winter wheat grain samples at 0.0100; 0.0200 and 0.200 mg·kg^{-1}, spiking levels (<Rec>), the standard deviations of the recoveries (SD) at $P = 0.95$ and $n = 5$, and the maximum residue levels (MPL) of pesticides in grain of cereals**

Вещество	Уровень добавки						МДУ, мг·кг$^{-1}$	
	0,0100 мг·кг$^{-1}$		0,0200 мг·кг$^{-1}$		0,200 мг·кг$^{-1}$			
	<Извл>, %	СО, %	<Извл>, %	СО, %	<Извл>, %	СО, %	РБ	ЕС
2,4-Д 2-этил-гексиловый эфир	105,8	6,9	104,6	2,4	103,1	4,1	2,0	2,0
Азоксистробин	94,3	2,7	98,8	3,8	97,7	1,6	0,5	0,5
Биксафен	112,5	3,1	114,0	3,6	104,0	1,5	0,5	0,05
Бифентрин	112,8	2,1	108,5	3,1	105,0	4,4	0,5	0,5
Боскалид	110,5	3,0	110,1	4,8	105,1	6,5	0,5	0,5
Галоксифоп-П-метил	106,5	4,3	103,8	2,4	106,8	3,8	НУ*	0,1
Гамма-цигалотрин	115,0	2,5	107,9	6,5	88,2	1,8	0,05	0,05
Диазинон	99,8	6,0	97,8	6,4	104,4	8,2	0,1	0,01
Диметахлор	103,8	4,8	99,4	4,9	105,3	6,1	НУ	0,02
Диметенамид	109,8	8,5	110,6	2,8	105,4	3,3	НУ	0,01
Диметоат	108,5	3,5	96,3	3,0	103,9	5,2	0,05	0,05
Димоксистробин	108,3	4,5	109,5	2,2	106,2	3,7	НУ	0,08
Дифеноконазол	94,5	7,6	100,4	7,0	100,4	0,8	0,08	0,1
Дифлюфеникан	104,5	2,6	102,5	2,3	106,1	3,6	0,05	0,02
Имазалил	100,3	8,4	96,0	8,0	99,1	4,3	0,1	0,05
Квизалофоп-П-тефурил	109,0	6,7	106,9	4,7	95,6	1,2	НУ	0,05
Квизалофоп-П-этил	100,0	7,9	105,9	3,9	104,3	7,5	НУ	0,05
Клоквинтосетмексил	102,8	4,9	113,3	5,2	106,9	4,5	0,1	НУ
Кломазон	101,3	5,9	100,6	4,4	104,7	6,7	НУ	0,01
Крезоксим-метил	100,0	3,5	99,0	2,0	103,4	3,6	НУ	0,08
Ленацил	108,3	4,6	104,8	3,0	103,5	4,9	НУ	0,1
Малатион	98,5	8,4	82,8	6,4	85,5	4,5	10,0	8,0
Металаксил	114,8	3,0	112,8	3,5	107,3	1,2	0,1	0,05
Метрафенон	107,0	4,8	105,4	4,1	105,1	3,4	0,5	0,07
Мефенпир-диэтил	104,0	4,2	102,6	4,5	103,4	3,7	0,5	НУ
Паклобутразол	102,3	6,5	105,6	3,0	103,2	2,6	НУ	0,02

Окончание табл. 2

Вещество	Уровень добавки						МДУ, мг·кг$^{-1}$	
	0,0100 мг·кг$^{-1}$		0,0200 мг·кг$^{-1}$		0,200 мг·кг$^{-1}$			
	<Извл>, %	СО, %	<Извл>, %	СО, %	<Извл>, %	СО, %	РБ	ЕС
Пендиметалин	93,8	3,5	93,8	3,0	105,3	4,9	0,01	0,05
Пенконазол	101,3	3,1	103,6	1,2	106,3	1,3	0,005	0,05
Пентиопирад	98,8	1,8	99,4	1,9	103,2	1,5	НУ	0,1
Пенфлуфен	100,8	4,1	111,6	4,0	107,8	2,0	НУ	НУ
Пикоксистробин	102,3	5,8	101,9	2,6	104,0	1,1	0,2	0,05
Пириметанил	105,0	3,9	103,3	3,5	106,7	5,2	НУ	0,05
Пиримифос-метил	104,5	2,9	98,4	6,1	104,2	6,3	7,0	5,0
Проквиназид	102,5	1,5	99,1	2,5	97,8	7,5	НУ	0,02
Прометрин	101,3	5,0	98,3	4,0	104,4	4,5	НУ	НУ
Пропамокарб	116,8	2,6	118,0	2,3	99,2	1,9	НУ	0,01
Пропиконазол	106,9	4,8	107,8	4,7	106,2	2,3	0,1	0,05
Просульфокарб	102,5	5,4	98,8	4,6	104,0	5,7	0,05	0,01
Протиоконазол-дестио	98,8	4,7	99,4	2,0	103,1	1,1	0,5	0,1
Прохлораз	97,3	7,7	91,0	7,7	89,6	2,3	2,0	0,5
Спироксамин	111,4	3,6	107,0	4,0	103,2	5,1	0,2	0,05
Тебуконазол	113,3	4,9	111,0	2,5	107,3	3,2	0,2	0,1
Тебуфенпирад	100,8	1,9	102,9	1,9	105,3	2,1	НУ	0,05
Тербутилазин	104,5	5,4	102,6	2,2	105,8	2,8	НУ	0,05
Тетраконазол	104,8	3,2	103,0	1,3	106,4	1,9	0,2	0,1
Тефлутрин	111,8	5,0	105,6	2,5	105,1	3,8	НУ	0,05
Тиаметоксам	105,5	4,4	107,6	4,1	104,6	2,2	0,05	0,05
Триадимефон	103,8	4,2	99,3	6,0	103,9	1,7	0,5	0,2
Тритиконазол	97,8	1,9	103,5	2,3	103,7	1,9	0,04	0,01
Фенбуконазол	104,8	6,2	101,1	1,9	100,5	3,3	0,2	0,1
Феноксапроп-П-этил	102,5	2,0	93,1	3,6	90,3	2,0	0,01	0,1
Феноксикарб	111,5	4,4	106,8	1,6	106,2	2,5	НУ	0,05
Фенпропидин	109,8	3,9	103,5	5,1	103,4	6,1	0,25	0,1
Фенпропиморф	103,5	4,2	101,4	4,2	103,8	5,3	0,5	0,5
Флуазифоп-П-бутил	105,5	3,1	102,9	2,7	106,5	3,9	НУ	0,1
Флуквинконазол	99,5	8,6	82,6	8,1	75,9	3,3	НУ	0,1
Флуксапироксад	103,5	6,0	105,1	6,9	106,0	3,3	НУ	0,4
Флуопиколид	105,0	2,0	102,8	2,1	104,8	3,1	НУ	0,01
Флуопирам	93,8	2,0	93,9	2,5	102,5	3,2	0,1	0,8
Флуроксипир-мептил	112,5	4,9	99,8	5,6	106,5	2,0	0,05	0,1
Флурохлоридон	103,3	5,3	85,8	7,6	94,6	7,1	НУ	0,1
Флуртамон	98,5	4,1	104,0	5,6	103,5	1,6	НУ	0,02
Флусилазол	107,0	4,2	102,3	1,9	104,7	1,1	0,2	0,01
Флуфенацет	103,5	2,9	90,0	5,7	97,6	4,4	НУ	0,1
Хлорпрофам	103,0	4,2	99,5	2,1	103,1	5,0	НУ	0,01
Хропирифос-метил	106,3	2,3	96,6	3,9	105,0	6,1	10,0	3,0
Ципродинил	95,8	8,6	98,8	2,9	102,5	5,7	0,5	0,5
Ципроконазол	101,0	6,1	103,0	3,3	103,5	1,9	0,05	0,1
Эпоксиконазол	114,3	2,7	112,9	3,0	108,2	5,6	0,2	0,6

П р и м е ч а н и е. *МДУ для данного пестицида в зерне хлебных злаков не установлен.

Из табл. 2 видно, что степень извлечения пестицидов из зерна озимой пшеницы, подготовленного по разработанной методике, находится в пределах 75,9–118,0 % для каждого уровня добавки, а среднее значение извлечения пестицидов составляет 86,0–111,8 %. Стандартные отклонения степеней извлечения пестицидов не превышали 8,6 %.

Таким образом, полученные валидационные параметры разработанной методики полностью удовлетворяют требованиям, предъявляемым к методикам определения остаточных количеств пестицидов в кормах и пищевых продуктах [20].

Разработанная методика использована для анализа 44 образцов зерна хлебных злаков на содержание остаточных количеств 18 препаративных форм пестицидов (17 действующих веществ), проходивших регистрационные испытания в Республике Беларусь в 2015 году. В результате исследований остаточные количества пестицидов были определены в 2 образцах в количестве 0,04 и 0,35 мг·кг$^{-1}$. При этом превышение МДУ не наблюдалось.

Заключение. Таким образом, в данной работе была разработана методика определения микроколичеств 69 пестицидов в зерне озимой пшеницы. В отличие от широко распространенной методики QuEChERS, в предложенной используются более дешевые реактивы и отсутствует дополнительная процедура очистки экстрактов твердофазными сорбентами. Разработанная методика валидирована по показателям точности (степени извлечения), прецизионности (стандартного отклонения определения), линейности и позволяет совместно определять остаточные количества 69 пестицидов на уровне ниже максимально допустимого. Предложенная методика была успешно использована для анализа реальных образцов зерна зерновых культур. Изложенная процедура пробоподготовки может также найти применение и в других аналитических лабораториях, контролирующих содержание остаточных количеств пестицидов в зерне хлебных злаков.

Список использованных источников

1. Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь: справ. изд. / Л. В. Плешко [и др.]. – Минск, 2014.

2. Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 27 сентября 2012 г. № 149: Гигиенические нормативы содержания действующих веществ пестицидов (средств защиты растений) в объектах окружающей среды, продовольственном сырье, пищевых продуктах / Гигиенический норматив. – Минск, 2012.

3. EU Pesticides Database. Search pesticide residues [Electronic resource] – Mode of access: http://ec. europa. eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN. – Date of access: 07.07.2016.

4. МУК 4.1.2054-06. Методические указания по определению остаточных количеств прохлораза в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: утв. Роспотребнадзором 10.04.2006. – М.: Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева; Учеб.-науч. консультац. центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов», 2006. – 9 с.

5. МУК 4.1.2068-06. Методические указания по определению остаточных количеств пендиметалина в зерне зерновых колосовых культур, риса, кукурузы, растительных маслах, зеленой массе кукурузы, рисовой соломке методом газожидкостной хроматографии: утв. Роспотребнадзором 05.05.2006. – Мытищи: ФедеР. науч. центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана; Роспотребнадзор, 2006. – 10 с.

6. МУК 4.1.1228-03. Определение остаточных количеств спироксамина в воде, почве, зерне, зеленой массе и соломе злаковых культур, винограде методом газожидкостной хроматографии. Методические указания: утв. РФ 16.03.2003. – Санкт-Петербург: СПб. НИИ лес. хоз-ва; Всерос. НИИ защиты растений, 2003. – 11 с.

7. МУК 4.1.2903-11. Определение остаточных количеств биксафена в воде, почве, зерне и соломе зерновых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания: утв. Роспотребнадзором 12.07.2011. – М.: Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева; Учеб.-науч. консультац. центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов», 2011. – 13 с.

8. МУК 4.1.1966-05. Определение остаточных количеств протиоконазола по его основному метаболиту протиоконазол-дестио в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом газожидкостной хроматографии. Методические указания: утв. Роспотребнадзором 21.04.2005. – Большие Вяземы : Всерос. НИИ фитопатологии, 2005. – 7 с.

9. МУК 4.1.2172-07. Определение остаточных количеств тау-флувалината в зерне и соломе зерновых культур, в ягодах и соке винограда, зеленой массе пастбищных трав, семенах и масле рапса, сои методом капиллярной газожидкостной хроматографии. Методические указания: утв. Роспотребнадзором 15.02.2007. – М.: Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева; Учеб.-науч. консультац. центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов», 2007. – 12 с.

10. Walorczyk, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry / S. Walorczyk // J. Chromatogr. A. – 2007. – Vol. 1165. – P. 200–212.

11. Walorczyk, S. Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. II. Improvement and extension to new analytes / S. Walorczyk // J. Chromatogr. A. – 2008. – Vol. 1208. – P. 202–214.

12. Walorczyk, S. Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry revisited / S. Walorczyk, D. Drożdżyński // J. Chromatogr. A. – 2012. – Vol. 1251. – P. 219–231.

13. The comparison of dispersive solid phase extraction and multi-plug filtration cleanup method based on multi-walled carbon nanotubes for pesticides multi-residue analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry / Y. Qin [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2015. – Vol. 1385. – P. 1–11.

14. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS / D. I. Kolberg [et al.] // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 125. – P. 1436–1442.

15. Multi-residue Determination of Organophosphorus Pesticides and Synthetic Pyrethroids in Wheat / I. A. T Khan [et al.] // Int. J. Agri. Biol. – 2007. – Vol. 9. – P. 905–908.

16. Gas Chromatographic Multi-Residue Pesticide Determination Method for Cereal Grains / R. Uddin [et al.] // Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci. – 2015. – Vol. 15. – P. 1617–1624.

17. Wilkowska, A. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology / A. Wilkowska, M. Biziuk // Food Chem. – 2011. – Vol. 125. – P. 803–812.

18. 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 / C. Díez [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2006. – Vol. 1131. – P. 11–23.

19. Zayats, M. A novel method of determination of some pesticides in vegetable oils based on dissociation extraction followed by gas chromatography/mass spectrometry / M. F. Zayats, S. M. Leschev, M. A. Zayats // Food Addit. Contam.: Part A, – 2016. – DOI: 10.1080/19440049.2016.1209575. Vol. 33. – P. 1337–1345.

20. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed [Electronic resource] / SANTE/11945/2015. – Mode of access: http://ec.europa. eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf. – Date of access: 19.04.2016.

References

1. Pleshko L. V., Khvalei O. A., Gololob T. I., Apanovich A. Iu., Boiarchuk V. E., Pesterev S. A., *Gosudarstvennyi reestr sredstv zashchity rastenii (pestitsidov) i udobrenii, razreshennykh k primeneniiu na territorii Respubliki Belarus': spravochnoe izdanie* [State Register of plant protection products (pesticides) and fretilizeds allowed for use in the Republic of Belarus: a reference book], Minsk, BY, 2014.

2. "Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus No. 149 of 27.09.2012 "On the Approval of Sanitary Norms and Regulations" Requirements for the Application, Conditions of Transport and Storage of Pesticides (Plant Protection Products), Agrochemicals and Mineral Fertilizers", Hygienic Standard "Hygienic Norms for the Content of Active Substances of Pesticides (Plant protection products) in environmental objects, food raw materials, foodstuffs" and the recognition of some Resolution of the Chief Sanitary Doctor the Republic of Belarus and their individual structural elements"", *Natsional'nyi reestr pravovykh aktov Respubliki Belarus'* [National Register of Legal Acts of the Republic of Belarus], 2012, no. 8/26455.

3. "EU Pesticides Database. Search pesticide residues", available at: http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN, (Accessed 07.07.2016).

4. *MUK 4.1.2054-06. Metodicheskie ukazaniia po opredeleniiu ostatochnykh kolichestv prokhloraza v vode, pochve, zerne i solome zernovykh kolosovykh kul'tur metodom vysokoeffektivnoi zhidkostnoi khromatografii: utv. Rospotrebnadzorom 10.04.2006* [Methodical instructions for determining the residual amounts of prochloraz in water, soil, grain and straw of cereal crops using the method of high-performance liquid chromatography: approved by Rospotrebnadzor on 10.04.2006], "Russ. State. Agrarian University - MAAA named after K.A. Timiryazev. Educational and scientific consulting center "Agroecology of pesticides and agrochemicals", Moscow, RU, 2006.

5. *MUK 4.1.2068-06. Metodicheskie ukazaniia po opredeleniiu ostatochnykh kolichestv pendimetalina v zerne zernovykh kolosovykh kul'tur, risa, kukuruzy, rastitel'nykh maslakh, zelenoi masse kukuruzy, risovoi solomke metodom gazozhidkostnoi khromatografii : utv. Rospotrebnadzorom 05.05.2006* [Methodical guidelines for the determination of residual amounts of pendimethalin in grain cereal crops, rice, maize, vegetable oils, green maize, rice straws by gas liquid chromatography: approved by Rospotrebnadzor on 05.05.2006], "Federal scientific center of hygiene named after F.F. Erisman", Mytischi, RU, 2006.

6. *MUK 4.1.1228-03. Opredelenie ostatochnykh kolichestv spiroksamina v vode, pochve, zerne, zelenoi masse i solome zlakovykh kul'tur, vinograde metodom gazozhidkostnoi khromatografii. Metodicheskie ukazaniia : utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 16.03.2003* [Determination of spiroxamine residual amounts in water, soil, grain, green mass and straw of cereals, grapes by gas-liquid chromatography. Methodical instructions: approved by Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation 16.03.2003], St. Petersburg Scientific Research. Institute of Forestry; All-Russ. Scientific Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, RU, 2003.

7. *MUK 4.1.2903-11. Opredelenie ostatochnykh kolichestv biksafena v vode, pochve, zerne i solome zernovykh kul'tur metodom vysokoeffektivnoi zhidkostnoi khromatografii. Metodicheskie ukazaniia : utv. Rospotrebnadzorom 12.07.2011* [Determination of bixapten residual amounts in water, soil, grain and straw of cereal crops by high-performance liquid chromatography. Methodical instructions: approved by Rospotrebnadzor 12/07/2011], "Russ. State Agrarian University - MAAA named after K.A. Timiryazev. Educational and scientific consulting center "Agroecology of pesticides and agrochemicals", Moscow, RU, 2011.

8. *MUK 4.1.1966-05. Opredelenie ostatochnykh kolichestv protiokonazola po ego osnovnomu metabolitu protiokonazol-destio v zerne i solome zernovykh kolosovykh kul'tur metodom gazozhidkostnoi khromatografii. Metodicheskie ukazaniia : utv. Rospotrebnadzorom 21.04.2005* [Determination of prothioconazole residual amounts by its main metabolite, prothioconazole-desthio in grain and straw of cereal crops, by gas-liquid chromatography. Methodical instructions: approved by Rospotrebnadzor on 21.04.2005], All-Russian Research Institute of Phytopathology, The Great Vyazemy, RU, 2005.

9. MUK 4.1.2172-07. Opredelenie ostatochnykh kolichestv tau-fluvalinata v zerne i solome zernovykh kul'tur, v iagodakh i soke vinograda, zelenoi masse pastbishchnykh trav, semenakh i masle rapsa, soi metodom kapilliarnoi gazozhidkostnoi khromatografii. Metodicheskie ukazaniia : utv. Rospotrebnadzorom 15.02.2007 [Determination of tau-fluvalinate residual amounts in grain and straw of cereals, in berries and grape juice, green mass of pasture grasses, seeds and oil of rapeseed, soybean by capillary gas-liquid chromatography. Methodical instructions: approved by Rospotrebnadzor 15.02.2007], "Russ. State Agrarian University - MAAA named after K.A. Timiryazev. Educational and scientific consulting center "Agroecology of pesticides and agrochemicals", Moscow, RU, 2007.

10. Walorczyk S., "Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1165, no. 1–2, pp. 200–212.

11. Walorczyk S., "Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. II. Improvement and extension to new analytes", *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1208, pp. 202–214.

12. Walorczyk S., Drożdżyński D., "Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry revisited", *Journal of Chromatography A*, 2012, vol. 1251, pp. 219–231.

13. Qin Y., Zhao P., Fan S., Han Y., Li Y., Zou N., Song S., Zhang Y., Li F., Li X., Pan C., "The comparison of dispersive solid phase extraction and multi-plug filtration cleanup method based on multi-walled carbon nanotubes for pesticides multi-residue analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 2015, vol. 1385, pp. 1–11.

14. Kolberg D. I., Prestes O. D., Adaime M. B., Zanella R., "Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS", *Food Chemistry*, 2011, vol. 125, pp. 1436–1442.

15. Khan I. A. T., Parveen Z., Ahmed R., Ahmed M., "Multi-residue Determination of Organophosphorus Pesticides and Synthetic Pyrethroids in Wheat", *International Journal Of Agriculture And Biology*, 2007, vol. 9, pp. 905–908.

16. Uddin R., Iqbal S., Baloch P. A., Bhutto A., Ahmed A., "Gas Chromatographic Multi-Residue Pesticide Determination Method for Cereal Grains", *American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences*, 2015, vol. 15, pp. 1617–1624.

17. Wilkowska A., Biziuk M., "Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology", *Food Chemistry*, 2011, vol. 125, pp. 803–812.

18. Díez C., Traag W. A., Zommer P., Marinero P., Atienza J., "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", *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1131, pp. 11–23.

19. Zayats M. F., Leschev S. M., Zayats M. A., "A novel method of determination of some pesticides in vegetable oils based on dissociation extraction followed by gas chromatography/mass spectrometry", *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 33, no. 8, DOI: 10.1080/19440049.2016.1209575. Vol. 33. – P. 1337–1345.

20. "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed", available at: http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf, (Accessed 19.04.2016).

Информация об авторах

Заяц Михаил Фёдорович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник лаборатории динамики пестицидов, Институт защиты растений (ул. Мира, 2, 223011, а/г Прилуки, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: mikhail_zayats@tut.by.

Information about the authors

Zayats Mikhail Fedorovich – Ph.D. (analytical chemistry), Leading Scientist of the Pesticide Dynamics Laboratory, Institute of Plant Protection (2 Mira Str., 223011, a/c Priluki, Minsk distr., Republic of Belarus). E-mail: mikhail_zayats@tut.by.

Для цитирования

Заяц, М. Ф. Разработка и валидация методики совместного определения остаточных количеств пестицидов в зерне озимой пшеницы методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / М. Ф. Заяц // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 51–60.

For citation

Zayats M. F. Development and validation of the method for co-determination of pesticide residues in winter wheat grain by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 51–60. (In Russian).

ISSN 0002-3590(print.)

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

ORGANIC CHEMISTRY

УДК 547.913

Поступила в редакцию 21.06.2016
Received 21.06.2016

Н. Г. Козлов[1], Л. И. Басалаева[1], Г. А. Атажанова[2], С. М. Адекенов[2]

[1]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Республика Казахстан

СИНТЕЗ АМИДОПРОИЗВОДНЫХ ПУЛЕГОНА

Осуществлена реакция Риттера пулегона с рядом как алифатических, так и ароматических нитрилов в присутствии каталитического количества концентрированной серной кислоты, которая протекает через образование третичного карбокатиона с последующим присоединением к нему молекулы нитрила и образованием кетоамида.

Ключевые слова: пулегон, третичный карбокатион, нитрилы, серная кислота, амиды, спектроскопия.

N. G. Kozlov[1], L. I. Basalaeva[1], G. A. Atazhanova[2], S. M. Adekenov[2]

[1]Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2] International Research and Production Holding «Fitochimiya», Karaganda, Republic of Kazakhstan

SYNTHESIS OF PULEGONE AMIDO DERIVATIVES

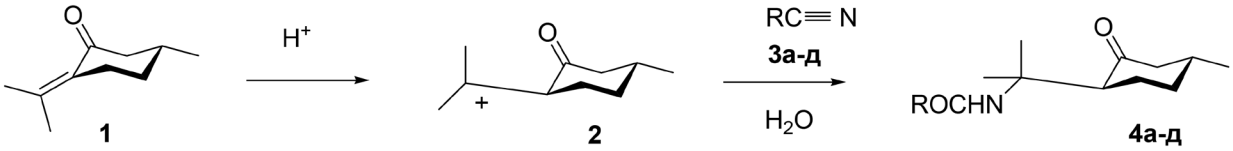
Ritter's reaction of pulegone with a number of both aliphatic and aromatic nitriles in the presence of catalytic amount of concentrated sulfuric acid proceeding through formation of a tertiary carbocation with the subsequent addition of nitrile molecule and formation of ketoamides, has been performed.

Keywords: pulegone, tertiary carbocation, nitriles, sulfuric acid, amides, spectroscopy.

Введение. Пулегон **1** представляет собой моноциклический ненасыщенный кетон *n*-ментанового ряда и является основным компонентом эфирных масел *Ziziphora clinopodioides* Lam. [1] и *Mentha longifolia* L. [2].

В научной и патентной литературе имеется большое число ссылок на работы, посвященные описанию свойств и биологической активности пулегона, однако о химической модификации этого монотерпенового кетона с целью синтеза азотсодержащих производных найдено только две публикации [3, 4].

Основная часть. В продолжение нашей работы по синтезу азотсодержащих пулегона [5] в настоящей работе для получения новых азотсодержащих производных нами осуществлена реакция Риттера пулегона с рядом как алифатических, так и ароматических нитрилов **3а-д** (ацетонитрилом **3а**, бутиронитрилом **3б**, валеронитрилом **3в**, фенилацетонитрилом **3г**, 1-нафтонитрилом **3д**) в присутствии каталитического количества концентрированной серной кислоты.



1 **2** **4а-д**

R = CH_3 (**а**), $CH_3(CH_2)_2$ (**б**), $CH_3(CH_2)_3$ (**в**), $C_6H_5CH_2$ (**г**) $C_{10}H_7$ (1-нафтил) (**д**)

Очевидно, процесс осуществляется через образование третичного карбокатиона **2** с последующим присоединением к нему молекулы нитрила и образованием амида. Реакция протекает строго стереоселективно с образованием индивидуального кетоамида с диэкваториальным расположением метильной и изопропиламидной групп. Свойства полученного соединения **4а** соот-

ветствуют литературным для полученного интермолекулярным С-Н аминированием, по типу реакции Риттера ментона, N-(2-(4-метил-2-оксоциклогексил)пропан-2-ил)ацетамида [6]. Амиды **4б–д** ранее в литературе не описаны.

В реакции Риттера важно, чтобы генерируемый ион карбония был достаточно стабилен, поскольку нитрильная группа – плохая ловушка для карбокатионов. В данной работе генерируется только третичный карбокатион **2**, поэтому протекание реакции зависит от способности нитрила присоединиться к этому иону карбония. Из изученных нами девяти нитрилов разного строения использование только четырех позволило получить N-(2-(4-метил-2-оксоциклогексил) пропан-2-ил-R-амиды **4а–д**. Реакцию проводили без растворителя, поскольку жидкие нитрилы смешивали с пулегоном, а кристаллические растворялись в нем. Оказалось, что динитрилы (β,β-диоксипропионитрил, тиодипропионитрил) или стерически затрудненные, такие как норборненкарбонитрил не вступают в реакцию присоединения к третичному карбокатиону **2**, образуя первичные амиды, соответствующие нитрилу кислоты, а проведение реакции с акрилонитрилом привело к полному осмолению реакционной смеси.

Строение полученных соединений **4а–д** установлены на основании данных ЯМР ^{1}H, ^{13}C, ИК-спектроскопии и элементного анализа. Полное отнесение сигналов в спектре ЯМР ^{1}H амидокетонов **4а-д** не представляется возможным вследствие взаимного перекрывания многих сигналов. Тем не менее, на основании данных этих спектров могут быть сделаны следующие выводы.

Сигнал метильной группы при атоме C^1 имеет вид дублета и проявляется при 0,78–1,05 м. д. Сигнал геминального по отношению к этой метильной группе протона имеет вид сложного мультиплета и проявляется в еще более сильном поле (0,74–0,85 м. д.), что указывает на его аксиальную ориентацию, а следовательно, на отсутствие инверсии цикла в ходе реакции.

Сигналы метильных групп при атоме C^8 имеют вид синглетов, что однозначно свидетельствует в пользу присоединения нитрила по этому атому (а не C^4, как альтернатива). При этом сигналы этих метильных групп резко неэквивалентны (1,14–1,53 м. д. и 1,26–1,75 м. д.), что указывает на отсутствие свободного вращения по связи C^4–C^8 и, очевидно, является следствием образования прочной водородной связи между кетогруппой и атомом водорода (NH) амидного фрагмента. Сигналы ароматических протонов соединений **4г, д** по положению и мультиплетности полностью соответствуют предлагаемой структуре.

Интерпретация спектров ЯМР ^{13}C полученных соединений, напротив, не вызывает затруднений. Отнесение сигналов сделано на основании сравнения со спектрами синтезированных ранее аналогов, а также их мультиплетности, определенной на основании данных DEPT. Так, в спектрах имеются два слабопольных синглетных сигнала, характерных для карбонильных атомов углерода: 210,2–211,8 и 168,3–172,0 м. д. (кетон и амид соответственно). Дублетные сигналы с химическими сдвигами 53,4–55,09 и 35,2–36,25 м. д. относятся к атомам C^4 и C^1 соответственно, а триплеты при 50,7–51,7 м. д., 28,0–33,5 и 27,4–34,0 м. д. – к атомам C^2, C^5 и C^6 соответственно. В спектре имеются также 4 квартетных сигнала метильных групп (δ 21,8; 23,2; 23,3 и 24,5 м. д.). Отсутствие квартетных сигналов в области 16,0 м. д. также указывает на экваториальную ориентацию метильной группы при атоме C^4. Синглетный сигнал связанного с алкил(арил)амидогруппой атома C^8 проявляется при 53,3–55,4 м. д.

В ИК-спектрах соединений **4а–д** присутствуют полосы поглощения в области 1705–1713 см$^{-1}$, характерные для валентных колебаний карбонильной группы. Валентные колебания карбонильной группы амидов присутствуют в области 1633–1646 см$^{-1}$ (амид I), деформационные колебания связи N–H в области 1536–1560 см$^{-1}$ (амид II). Валентные колебания атомов Н аминогруппы проявляются в области 3293–3325 см$^{-1}$.

Полосы валентных колебаний С–Н связей в ароматических ядрах у соединений **4г, д** находятся при 3257–2952 см$^{-1}$.

Экспериментальная часть. ИК-спектры соединений записаны на Фурье-спектрофотометре Nicolet Protege-460 в тонком слое или в таблетках KBr. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C регистрировали на спектрометре AVANCE-500 фирмы Bruker-Biospin (рабочая частота 500 и 125 МГц для ядер ^{1}H и ^{13}C соответственно). Концентрация растворов составляла 2–5% в DMSO-d_6, химические

сдвиги определяли относительно внутреннего стандарта – ТМС. Элементный анализ осуществлен на CHNS анализаторе VarioMICRO superuser. Температуры плавления веществ определены на блоке Кофлера.

Пулегон (2-изопропилиден-5-метил-циклогексанон). Выделяли из эфирного масла *Ziziphora interrupta* Juz. (зизифора прерывчатая). Надземную часть зизифоры прерывчатой собирали в Кордайском районе (окр. п. Гвардейский) Жамбылской области Республики Казахстан в июне 2010 г. в фазу цветения-плодоношения. Выход эфирного масла составил 0,3%. Всего идентифицирован 21 компонент, что составляет 58,35% от всех обнаруженных. Основными компонентами эфирного масла зизифоры прерывчатой являются: пулегон – 36,1%, 8-гидрокси-4(5)-*n*-ментен-3-он – 10,27%, изоментон – 6,02%.

Эфирное масло зизифоры прерывчатой в количестве 40 г перегоняли под вакуумом, собирая фракцию с $T_{кип}$ 89–94°/15 мм рт. ст. Полученную фракцию количеством 14,4 г дополнительно очищали методом колоночной хроматографии. В качестве адсорбента использовали SiO_2 (соотношение вещество–адсорбент, 1:15). Элюирование проводили петролейным эфиром. Получили 10,0 г пулегона.

$T_{кип.}$ 89–94°/10 мм рт. ст.; $[\alpha]_{20}$ +22° (с 0.50, $CHCl_3$); $n^{22}{}_D$: 1.4790; $d^{20}{}_4$: 0.9357; ИК-спектр : ν, $см^{-1}$: 3466, 2958, 2927, 2873, 2851, 1738 (C=O), 1711, 1679 (C=C), 1620, 1552, 1456, 1437, 1419, 1373, 1335, 1287, 1264, 1240, 1209, 1128, 1092, 1074, 1025, 986, 806.

Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м. д.: 1.01 с (3H, CH_3), 1.76 с (3H, CH_3), 1.93 с (3H, CH_3). Спектр ЯМР ^{13}C, δ, м. д.: 31.72 д (д, C^5), 51.06 т (C^6), 200.83 с (C^1), 130.02 с (C^2), 28.80 т (C^3), 33.27 т (C^4), 22.06 к (C^7), 23.04 к (C^9), 139.32 с (C^8), 22.13 к (C^{10}).

N-(2-(4-метил-2-оксоциклогексил)пропан-2-ил)амиды (4а-д). Растворяли 2 г (0,013 моль) пулегона **1** в 10 мл нитрила при 0 °С и медленно по каплям прибавляли 2 мл концентрированной серной кислоты. Смесь перемешивали при комнатной температуре 18 ч, затем нейтрализовали водным раствором аммиака при охлаждении реакционной смеси. Продукт реакции экстрагировали эфиром, после сушки над $MgSO_4$ и упаривания растворителя полученные кристаллы высушивали на воздухе.

N-(2-(4-метил-2-оксоциклогексил)пропан-2-ил)ацетамид (4а). Выход 1,55 г (56%), $T_{пл}$ 97–99 °С. ИК-спектр, ν, $см^{-1}$): 3293 (NH), 3088, 2949, 2926, 2868, 1710 (C=O), 1643 (C=O, амид 1), 1560 (NH, амид 2), 1455, 1440, 1368, 1300, 1205, 1121, 1053, 610. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м. д.: 0.83 м (1H), 0.91 д (3H, CH_3), 1.17 с (3H, CH_3), 1.33 с (3H, CH_3), 1.71 м (2H), 1.75 с (3H, с, $NHCOCH_3$), 1.94 м (3H), 2.06 м (2H), 7.33 с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C, δ, м. д.: 21.82 к (CH_3), 23.25 к (CH_3), 23.34 к (CH_3), 24.5 к (CH_3), 27.41 т (C^6), 33.52 т (C^5), 35.26 д (C^4), 51.14 т (C^3), 53.32 с (C^8), 53.45 д (C^1), 168.37 с (NHCO), 210.23 с (C^2). Найдено, %: C 68.17; H 10.41; N 6.43. $C_{12}H_{21}NO_2$. Вычислено, %: C 68.21; H 10.02; N 6.63.

N-(2-(4-метил-2-оксоциклогексил)пропан-2-ил)бутирамид (4б). Выход 1,2 г (38%), $T_{пл}$ 60–62 °С. ИК-спектр, ν, $см^{-1}$: 3325 (NH), 3074, 2959, 2930, 2872, 1710 (C=O), 1642 (C=O, амид 1), 1550 (NH, амид 2), 1454, 1382, 1362, 1323, 1291, 1217, 1154, 1119, 1099, 1052, 921, 692, 547. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м. д.: 0.76 т (3H, $(CH_2)_2\underline{CH_3}$), 0.86 д (3H, CH_3), 1.24 с (3H, CH_3), 1.26 с (3H, CH_3), 1.45 м (CH_2–$\underline{CH_2}$–CH_3), 1.76 м (2H), 1.83 м (1H), 1.92 т ($\underline{CH_2}$–CH_2 –CH_3), 1.96 м (3H), 2.11 м (2H), 3.24 д. д (1H), 5.76 с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C: 12.60 к (CH_2–CH_2 –$\underline{C}H_3$), 18.14 т (CH_2–$\underline{C}H_2$ –CH_3), 21.23 к (C^7), 23.52 к (C^9), 24.56 к (C^{10}), 27.51 т (C^5), 33.14 т (C^6), 35.10 д (C^4), 38.53т ($\underline{C}H_2$–CH_2–CH_3), 50.71 т (C^3), 53.46 с (C^8), 53.82 д (C^1), 171.67 с (NHCO), 210.96 с (C=O). Найдено, %: C 70.32; H 10.49; N 5.90. $C_{14}H_{25}NO_2$. Вычислено, %: C 70.25; H 10.53; N 5.85. M 239.19.

N-(2-(4-метил-2-оксоциклогексил)пропан-2-ил)пентанамид (4в). Выход 2 г (61%), $T_{пл}$ 65–66 °С. ИК-спектр, ν, $см^{-1}$: 3320 (NH), 3085, 2971, 2942, 2875, 2864, 1712 (C=O), 1646 (C=O, амид 1), 1543 (NH, амид 2), 1462, 1382, 1362, 1320, 1297, 1204, 1158, 1123, 1098, 1055, 920, 694, 546. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м. д.: 0.68 т (3H, $(CH_2)_3\underline{CH_3}$), 0.77 д (3H, CH_3), 1.17 с (3H, CH_3), 1.41 м (CH_2–$\underline{CH_2}$–CH_2 –CH_3), 1.75 с (3H, CH_3), 1.92 т ($\underline{CH_2}$– CH_2 –CH_2 –CH_3), 1.94 т (CH_2– CH_2 –$\underline{CH_2}$ –CH_3), 1.98 м (3H), 2.02 м (2H), 2.21 м (2H), 3.29 д. д (1H), 6.03 с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C: 12.91 т (CH_2–CH_2–CH_2 –$\underline{C}H_3$), 23.55 к (C^7), 24.36 к (C^{10}), 26.83 к (C^9), 27.02 т (C^5), 27.67м (CH_2–CH_2–$\underline{C}H_2$ –CH_3), 33.28 т (C^6), 34.69м (CH_2–$\underline{C}H_2$–CH_2 –CH_3), 35.18 м ($\underline{C}H_2$–CH_2–CH_2 –CH_3), 36.25 т (C^4), 50.85 д (C^3), 53.86 с (C^8),

54.26 д (C^1), 172.09 с (NHCO), 211.03 с (C=O). Найдено, %: C 71.18; H 10.69; N 5.50. $C_{15}H_{27}NO_2$. Вычислено, %: C 71.10; H 10.74; N 5.53. M 253,20.

N-(2-(4-метил-2-оксоциклогексил)пропан-2-ил)фенилацетамид (4г). Выход 1,2 г (32%), $T_{пл}$ 76–77 °C. ИК-спектр, ν, $см^{-1}$: 3310 (NH), 3063, 2952, 2869, 1713 (C=O), 1636 (C=O, амид 1), 1546 (NH, амид 2), 1494, 1453, 1385, 1363, 1320, 1203, 1140, 733, 700. Спектр ЯМР ^1H, δ, м. д.: 0.85 д (3H, CH_3), 1.14 с (3H, CH_3), 1.31 с (3H, CH_3), 1.60 м (2H), 1.70 м (2H), 1.80 м (3H), 1.90 м (1H), 3.20 д. д (1H), 6.80 с (1H, NH), 7.127.25 м ($5H_{аром}$) Спектр ЯМР ^{13}C: 22.31 к (C^7), 24.54 к (C^9), 25.12 к (C^{10}), 28.02 т (C^5), 34.08 т (C^6), 35.84 д (C^4), 51.74 т (C^3), 54.15 с (C^8), 55.15 д (C^1), 126 ($C^{4'}$), 128 ($C^{5'}$, $C^{3'}$), 129 ($C^{6'}$, $C^{2'}$), 137 ($C^{1'}$), 169.83 с (NHCO), 210.92 с (C=O). Найдено, %: C 75.26; H 8.80; N 4.83. $C_{18}H_{25}NO_2$. Вычислено, %: C 75.22; H 8.77; N 4.87. M 287.19.

N-(2-(4-метил-2-оксоциклогексил)пропан-2-ил)нафтиламид (4д). Выход 1,7 г (41%), $T_{пл}$ 125–126 °C. ИК-спектр, ν, $см^{-1}$: 3301 (NH), 3257, 3056, 2950, 2922, 2863, 1705 (C=O), 1633 (C=O, амид 1), 1536 (NH, амид 2), 1452, 1359, 1318, 1303, 1259, 1191, 1154, 1122, 808, 786, 574. Спектр ЯМР ^1H, δ, м. д.: 1.02 д (3H, CH_3), 1.53 с (3H, CH_3), 1.56 с (3H, CH_3), 1.72 м (2H), 1.83 м (1H), 1.87 м (1H), 2.13 т (1H), 2.24 м (1H), 2.31 д. д. (1H), 3.60 д. д (1H), 6.30 с (1H, NH), 7.41 д. д. ($1H_{аром}$), 7.49 д. д. ($1H_{аром}$), 7.53 т ($1H_{аром}$), 7.54 д. ($1H_{аром}$), 7.86 д. ($1H_{аром}$), 8.26 д. ($1H_{аром}$), 8.83 д. ($1H_{аром}$). Спектр ЯМР ^{13}C: 22.30 к (C^7), 24.54 к (C^9), 25.70 к (C^{10}), 28.70 т (C^5), 34.20 т (C^6), 36.10 д (C^4), 51.70 т (C^3), 55.40 с (C^8), 55.09 д (C^1), 115.78 ($C^{8'}$), 120.34 ($C^{4'}$, $C^{5'}$), 121.25 ($C^{4a'}$), 121.67 ($C^{3'}$, $C^{6'}$), 122.31 ($C^{8a'}$), 127.51 ($C^{2'}$, $C^{7'}$), 169.10 с (NHCO), 211.80 с (C=O). Найдено, %: C 77.92; H 8.03; N 4.30. $C_{21}H_{25}NO_2$. Вычислено, %: C 77.98; H 7.79; N 4.33. M 323.19.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Х16Р-023).

Acknowledgements

This work has been performed with financial support of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant № Х16Р-023).

Список использованных источников

1. Горяев, М. И. Эфирные масла флоры СССР / М. И. Горяев. – Алма-Ата: АН КазССР, 1952. – 191 с.

2. Егеубаева, Р. А. Дикорастущие эфиромасличные растения юго-востока Казахстана / Р. А. Егеубаева. – Алматы, 2002. – 66 с.

3. Синтез, кристаллическая и молекулярная структура изоксазольного производного пулегона / Д. Т. Садырбеков [и др.] // Химия природ. соед. – 2005. – № 1. – С. 83–84.

4. Synthesis and Crystal Structure of Pyrazoline Derivative of Pulegone / Y. M. Suleimenov [et al.] // Heterocycles. – 2000. – Vol. 53, № 12. – P. 2661–2677.

5. Синтез производных монотерпеноида пулегона / Н. Г. Козлов [и др.] // Химия природ. соед. – 2015. – № 3. – С. 424–426.

6. Michaudel, Q. Intermolecular Ritter-Type C-H Amination of Unactivated sp^3 Carbons / Q. Michaudel, D. Thevenet, P. S. Baran // J. Am. Chem. Soc. – 2012. – Vol. 134. – P. 2547–2549.

7. Гордон, А. Спутник химика / А. Гордон, Р. М. Форд. – М: Мир, 1976. – 541 с.

References

1. Goriaev M. I., *Efirnye masla flory SSSR* [Essential oils of USSR plants], Izd-vo AN KazSSR, Alma-Ata, KZ, 1952.

2. Egeubaeva R. A. *Dikorastushchie efiromaslichnye rasteniia Iugo-Vostoka Kazakhstana* [Wild volatile-oil-bearing plants from South-East of Kazakhstan], Almaty, KZ, 2002.

3. Sadyrbekov D. T., Atazhanova G. A., Kulyiasov A. T., Raldugin V. A., Bagrianskaia I. Iu., Gatilov Iu. V., Edil'baeva T. T., Turdybekov K. M., Adekenov S. M., "Synthesis, crystalline and molecular structure of the pulegone isoxazole derivative", *Khimiia prirodnykh soedinenii* [Chemistry of natural compounds], 2005, no. 1, pp. 83–84.

4. Suleimenov E. M., Khan A. M., Atazhanova G. A., Choudhary M. I., Khasenov B. B., Kulyjasov A. T., Turdybekov K. M., Dembitsky A. D., Adekenov S. M., "Atta-ur-Rahman/Synthesis and Crystal Structure of Pyrazoline Derivative of Pulegone", *Heterocycles*, 2000, vol. 53, pp. 2661– 2677.

5. Kozlov N. G., Basalaeva L. I., Atazhanova G. A. Adekenov S. M., "Synthesis of pulegone derivatives", *Khimiia prirodnykh soedinenii* [Chemistry of natural compounds], 2015, no. 3, pp. 424–426.

6. Michaudel Q., Thevenet D., Baran P. S., "Intermolecular Ritter-Type C-H Amination of Unactivated sp3 Carbons", *Journal of the American Chemical Society*, 2012, vol. 134, pp. 2547–2549.

7. Gordon A., Ford R., *Sputnik khimika* [Chemist's Companion], Mir, Moscow, RU, 1976.

Информация об авторах

Козлов Николай Гельевич – д-р. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: loc@ifoch.bas-net.by.

Басалаева Людмила Ивановна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Basalaeva@ifoch.bas-net.by.

Атажанова Гаянэ Абдулкахимовна – член-кор., д-р хим. наук, профессор, зав. лаб. химии терпеноидов, Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» (ул. М. Газалиева, 4, 100009, Караганда, Республика Казахстан). E-mail: g\-atazhanova@yandex.ru.

Адекенов Сергазы Мынжасарович – академик, д-р хим. наук, профессор, председатель правления, Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» (ул. М. Газалиева, 4, 100009, Караганда, Республика Казахстан). E-mail: arglabin@phyto.kz.

Для цитирования

Синтез амидопроизводных пулегона / Н. Г. Козлов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 61–65.

Information about the authors

Kozlov Nikolay Gelevich – D. Sc. (Chemistry), Senior Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13 Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: loc@ifoch.bas-net.by.

Basalaeva Ludmila Ivanovna – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13 Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Basalaeva@ifoch.bas-net.by.

Atazhanova Gayane Abdulkahimovna – Cor. Member, D.Sc. (Chemistry), Professor, head of the laboratory of chemistry of terpenoid, Joint-stock company «International research and production holding «Fitokhimiya» (4 M. Gazaliyeva Str., 100009, Karaganda, Republic of Kazahstan). E-Mail: g\-atazhanova@yandex.ru.

Adekenov Sergazy Munzasarovich – Academician, D.Sc. (Chemistry), Professor, Chairman of the board, Joint-stock company «International research and production holding «Fitokhimiya» (4 M. Gazaliyeva Str., 100009, Karaganda, Republic of Kazahstan). E-mail: arglabin@phyto.kz.

For citation

Kozlov N. G., Basalaeva L. I., Atazhanova G. A., Adekenov S. M. Synthesis of pulegone amido derivatives. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 61–65. (In Russian).

ISSN 0002-3590(print.)

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 543.544.17:577.152.28

Поступила в редакцию 16.12.2016
Received 16.12.2016

С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко, К. Ю. Рипинская

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНОЙ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ P1-1 ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ АФФИННЫХ МЕМБРАН И СВОЙСТВА ОЧИЩЕННОГО ФЕРМЕНТА

Глутатион-S-трансфераза P1-1 (GSTP1-1) человека является диагностически важным ферментом, гиперэкспрессия которого в опухолях и лимфомах приводит к формированию множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Небольшие количества фермента можно выделить из эритроцитов, однако известные методы очистки не позволяют получить препараты с высокой удельной активностью и хорошим выходом. С целью разработки более эффективной процедуры очистки эритроцитарной GSTP1-1 в настоящей работе впервые получены и охарактеризованы глутатионсодержащие аффинные мембраны на основе химически модифицированной целлюлозной бумаги. Мембраны успешно использованы для очистки фермента вместо традиционных агарозно-гелевых адсорбентов. Разработан новый метод выделения и очистки GSTP1-1 из гемолизата эритроцитов, включающий предварительное удаление гемоглобина на анионообменнике и аффинную хроматографию фермента на картридже с глутатионсодержащими мембранами. По эффективности (выход фермента 76,5 %, степень очистки 23589 раз, удельная активность 104,5 Ед/мг белка) предложенный метод значительно превосходит ранее опубликованные. Гомогенность полученного препарата, по данным гель-электрофореза и масс-спектрометрии, составляет не менее 95%. Найдены стационарные кинетические параметры очищенной GSTP1-1 в реакции конъюгации глутатиона (GSH) и 1-хлор-2,4-динитробензола (CDNB) при pH 6,5 и 25 °C: для GSH K_m = 0,19 мМ, k_{cat} = 47,8 $с^{-1}$; для CDNB K_m = 0,68 мМ, k_{cat} = 54,3 $с^{-1}$. Результаты работы представляют интерес для скрининга новых ингибиторов фермента с противоопухолевой активностью. Полученные аффинные мембраны могут быть использованы при выделении нативных и рекомбинантных глутатион-S-трансфераз (GST) из различных источников, а также гибридных белков с GST-доменом.

Ключевые слова: глутатион-S-трансфераза P1-1 (GSTP1-1), эритроциты, аффинные мембраны, адсорбция, выделение и очистка фермента, хроматография, удельная активность, кинетические параметры.

S. N. Gilevich, Yu. V. Brechka, K. Yu. Ripinskaya

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

PREPARATION OF HIGHLY ACTIVE HUMAN ERYTHROCYTE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1-1 USING AFFINITY MEMBRANES, AND PROPERTIES OF THE PURIFIED ENZYME

Human glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) is an important enzyme in clinical diagnostics since its overexpression in solid tumours and lymphomas largely contributes to multiple drug resistance of cancer cells. Small amounts of the enzyme can also be isolated from erythrocytes. However, known isolation methods are disadvantageous and do not allow to obtain the purified enzyme in good yield and with high specific activity (≥ 100 U/mg protein). In order to elaborate more effective purification procedure for the erythrocyte GSTP1-1, we have for the first time synthesized and investigated glutathione-containing affinity membranes based on chemically modified cellulose paper. The membranes have been shown to successfully replace conventional glutathione-agarose affinity gels in the enzyme purification. To isolate and purify GSTP1-1 from erythrocyte hemolysate, a novel two-step method has been developed involving preliminary hemoglobin removal on a small anion exchange column and further affinity chromatography on the cartridge with glutathione-containing membranes. In terms of activity yield (76.5%), purification factor (23589-fold), and specific activity of the purified enzyme (104.5 U/mg), the method is notably superior to previously published procedures. Gel electrophoretic and MALDI-TOF mass spectrometric analyses reveal apparent homogeneity (≥ 95%) of the obtained preparation. Steady-state kinetic parameters have been determined for the purified GSTP1-1 in the conjugation reaction between glutathione and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene at pH 6.5 and 25 °C: for the former substrate, K_m = 0.19 mM, k_{cat} = 47.8 s^{-1}; for the latter, K_m = 0.68 mM, k_{cat} = 54.3 s^{-1}. The results of the present work may be useful for screening new enzyme inhibitors with possible antitumour activity. The affinity membranes may also find application in isolating native and recombinant glutathione S-transferase (GST) isoforms from various sources, as well as fusion proteins with GST tag.

Keywords: glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1), erythrocytes, affinity membranes, adsorption, enzyme isolation and purification, chromatography, specific activity, kinetic parameters.

© Гилевич С. Н., Бречко Ю. В., Рипинская К. Ю., 2017

Введение. К глутатион-S-трансферазам (GST, КФ 2.5.1.18) относится многочисленное семейство ферментов, катализирующих реакции конъюгации восстановленного глутатиона (GSH) с различными электрофильными соединениями. GST выполняют важнейшую защитную функцию в организме, обеспечивая детоксикацию ксенобиотиков (токсины, канцерогены, цитостатики и другие лекарственные препараты) с последующей экскрецией их глутатионовых производных из клетки. В зависимости от локализации все GST подразделяются на три обширные группы: цитозольную, митохондриальную и микросомальную. Цитозольные GST млекопитающих включают не менее 18 изоформ в составе 7 генонезависимых классов, обозначаемых греческими буквами α, μ, π, σ, θ, ω и ζ; изоформы отличаются по спектру каталитической активности и уровню экспрессии в органах и тканях [1–3]. У человека важное клинико-диагностическое значение имеет изоформа P1-1 (GSTP1-1), относящаяся к π-классу и обнаруженная в плаценте, головном мозге, кишечнике, легких, молочной железе, матке и других органах, за исключением печени [2]. Гиперэкспрессия GSTP1-1 во многих твердых опухолях и лимфомах приводит к формированию множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Уровень экспрессии GSTP1-1 является одним из прогностических факторов в терапии рака [2, 4]. Изоформа P1-1 также экспрессируется в эритроцитах, где активность фермента служит биомаркером общей интоксикации организма [5].

Для выделения и очистки эритроцитарной GSTP1-1 часто используют колоночную аффинную хроматографию на агарозном геле с иммобилизованным GSH или GSHx (S-гексилглутатион) [6–10]. Стоимость коммерческой GSH-агарозы достаточно высока: около 240 евро за 10 мл геля. По ряду причин (низкое содержание фермента в исходном материале, наличие огромных количеств сопутствующего гемоглобина, групповая специфичность глутатионовых аффинных лигандов ко всему семейству GST) данная процедура не позволяет одностадийно получить гомогенный препарат GSTP1-1 с высокой удельной активностью, лишенный примеси других изоформ GST. Чтобы отделить анионную изоформу P1-1 от катионных и нейтральных изоформ, найденных в крови и относящихся к классам α, μ и θ, аффинную хроматографию дополняют хроматофокусированием или катионообменной хроматографией на производных декстрана и агарозы. Катионообменники обычно применяют на предварительной стадии очистки, где требуется колонка очень большого размера, позволяющая адсорбировать не только примесные изоформы, но и весь гемоглобин из гемолизата эритроцитов; при этом GSTP1-1 не связывается с адсорбентом [6, 7, 9]. Потери активности фермента в ходе многостадийной и трудоемкой очистки достигают 50–90% [8, 11]. Удельная активность очищенных препаратов в стандартной реакции конъюгации GSH и 1-хлор-2,4-динитробензола (CDNB) составляет 24–66 Ед/мг белка [8, 10, 11]. У более изученной GSTP1-1 из плаценты аналогичный показатель значительно выше – 80–136 Ед/мг для нативного фермента [12, 13] и 81–128 Ед/мг для рекомбинантного фермента, экспрессированного в *E. coli* [14, 15]. Значения кинетических параметров эритроцитарной GSTP1-1, найденные разными авторами, отличаются на порядок [8, 10]. Отсюда следует актуальность разработки новых, более эффективных подходов к выделению фермента.

Известно, что биоспецифические мембранные адсорбенты обладают рядом преимуществ по сравнению с аналогичными агарозными гелями и успешно используются для твердофазной экстракции, выделения и очистки природных и рекомбинантных белков [16]. В отношении GST аффинные мембраны до сих пор не применялись; сведений о мембранах с ковалентно иммобилизованным GSH также не имеется. Ранее нами была проведена иммобилизация иминодиацетатных и нитрилотриацетатных лигандов на химически активированных целлюлозных мембранах и показано высокое сродство полученных металлоаффинных адсорбентов к гемоглобину [17, 18]. Идея настоящей работы основана на получении аффинных мембран нового типа путем присоединения GSH к активированному целлюлозному носителю. Цель работы – с помощью глутатионсодержащих аффинных мембран разработать новый, высокоэффективный метод выделения и очистки эритроцитарной GSTP1-1 и охарактеризовать очищенный фермент по физико-химическим и каталитическим свойствам.

Материалы и методы исследования. В работе использовали: AGE – аллилглицидиловый эфир, ECH – эпихлоргидрин, BDGE – диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола, DVS – дивинил-

сульфон, DTT – дитиотреит, SDS – додецилсульфат натрия, 2-меркаптоэтанол, набор белковых маркеров для гель-электрофореза («Sigma-Aldrich», США); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид («Fluka», Швейцария); BSA – сывороточный альбумин быка, HSA – сывороточный альбумин человека («Serva», Германия); EDTA – Na_2-соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, глицин, DMSO – диметилсульфоксид («AppliChem», Германия); tris – трис(гидроксиметиламинометан) («Melford», Великобритания); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Alfa Aesar», Германия); DEAE-сефарозу CL-6B («Pharmacia», Швеция). GSH-агарозу (26,7 мкмоль GSH/мл геля) синтезировали известным способом [19]. Остальные реактивы имели квалификацию «х. ч.» или «ч. д. а.». N-бромсукцинимид (NBS) перед использованием перекристаллизовывали из воды.

Получение глутатионсодержащих аффинных мембран. Исходным материалом служили листы целлюлозной бумаги для блоттинга Whatman GB003 («GE Healthcare», США). Стадии синтеза и структура целевых продуктов схематически представлены на рис. 1.

При получении мембран Cell-SG-A бумагу активировали AGE, взяв за основу известную реакцию аллилирования полисахаридных гелей [20]; условия реакции (температуру, длительность, концентрацию NaOH и DMSO) предварительно оптимизировали. Далее к двойной связи привитых аллильных групп присоединяли NBS, используя водный раствор реагента; образовавшийся бромгидрин замыкали в эпоксид разбавленным NaOH; эпоксидный цикл селективно раскрывали тиольной группой GSH при pH 7,5; аминогруппа трипептида в этих условиях не реагирует [19]. Целевой продукт содержит гидрофильный семиатомный линкер между иммобилизованным лигандом и носителем.

Мембраны Cell-SG-B синтезировали, используя известный способ активации мембранных фильтров ECH [21] с некоторыми изменениями концентрации реагентов. Эпоксидные группы

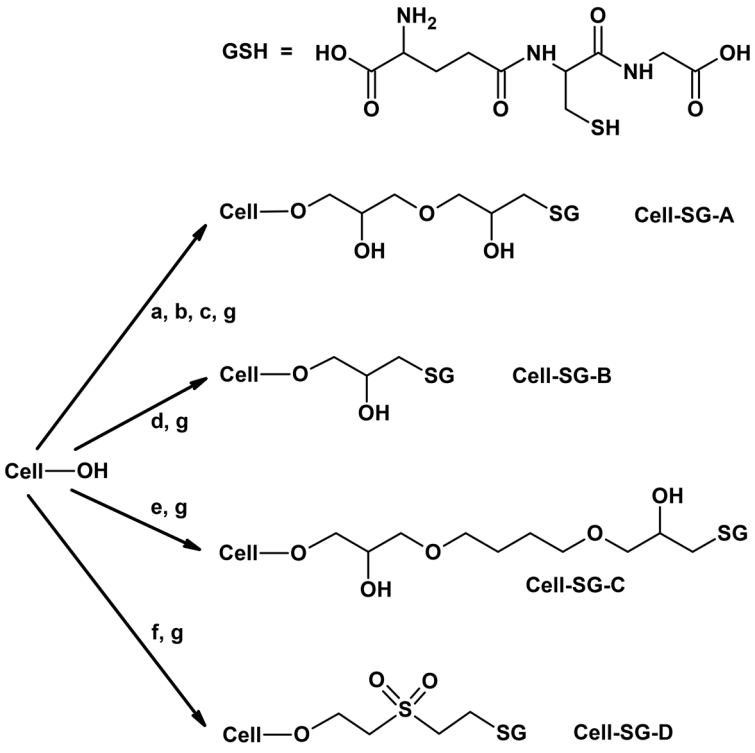


Рис. 1. Схема получения глутатионсодержащих мембран Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D из исходного материала (Cell–OH). Реагенты и условия реакций: *a* – NaOH, DMSO, AGE, 30 °C, 48 ч; *b* – NBS, H_2O, 25 °C, 2 ч; *c* – 0,01 M NaOH, 25 °C, 1,5 ч; *d* – NaOH, ECH, 25 °C, 6 ч; *e* – NaOH, BDGE, 30 °C, 6 ч; *f* – DVS, pH 11, 25 °C, 4 ч; *g* – GSH, pH 7,5, 30 °C, 24 ч

Fig. 1. Preparation scheme of Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C and Cell-SG-D glutathione-containing membranes from the starting material (Cell–OH). Reagents and conditions: *a* – NaOH, DMSO, AGE, 30 °C, 48 h; *b* – NBS, H_2O, 25 °C, 2 h; *c* – 0.01 M NaOH, 25 °C, 1.5 h; *d* – NaOH, ECH, 25 °C, 6 h; *e* – NaOH, BDGE, 30 °C, 6 h; *f* – DVS, pH 11, 25 °C, 4 h; *g* – GSH, pH 7.5, 30 °C, 24 h

активированного носителя вводили в реакцию с GSH, как описано выше. Целевой продукт имеет короткий трехатомный линкер между лигандом и носителем.

Синтез мембран Cell-SG-C проводили аналогично, активируя носитель диэпоксидом (BDGE) по методике [17] и далее присоединяя GSH по свободным эпоксидным группам. В целевом продукте лиганд связан с носителем посредством амфифильного 12-атомного линкера.

При получении мембран Cell-SG-D за основу взята методика активации агарозных гелей DVS [22], адаптированная нами для мембранного формата. К винилсульфоновым группам активированного носителя присоединяли GSH (реакция Михаэля); в результате между лигандом и носителем формируется амфифильный пятиатомный линкер.

По окончании синтеза остаточные активные группы всех мембран блокировали 0,35 М 2-меркаптоэтанолом (pH 8,3) в течение 24 ч. Концентрацию иммобилизованного GSH принимали равной концентрации привитых NH_2-групп, которую определяли спектрофотометрически по реакции с нингидрином [23]. Длину линкера оценивали как расстояние между проксимальным и дистальным атомами С после 3D-оптимизации структуры в программе ACD ChemSketch.

Равновесная бэтч-адсорбция GSTP1-1 на аффинных мембранах. Связывание GSTP1-1 полученными мембранами изучали равновесным бэтч-методом при 10 °С и pH 7,0 в 25 мМ КФБ (калий-фосфатный буфер с добавкой 1 мМ EDTA и 1 мМ DTT). На данном этапе исследований фермент выделяли из осветленного гемолизата эритроцитов колоночной хроматографией на DEAE-сефарозе (методика приведена ниже) и далее очищали на колонке с GSH-агарозой по методике [13]. Эксперименты проводили в пластиковых 1 см-кюветах, содержащих фрагменты мембран 5×5 мм. Для подавления неспецифической адсорбции мембраны предварительно обрабатывали раствором BSA (2 мг/мл) в том же буфере и хорошо промывали чистым буфером. Очищенную GSTP1-1 (0,4–4 Ед активности; 91,5 Ед/мг белка) адсорбировали из объема 0,2 мл в течение 2 ч со встряхиванием на орбитальном шейкере; указанное время необходимо для достижения адсорбционного равновесия. Затем жидкие фазы переносили в отдельные микропробирки на ледяной бане; из микропробирок по очереди отбирали аликвоты содержимого и определяли остаточную активность фермента. Количество адсорбированной GSTP1-1 рассчитывали по разнице между исходной и остаточной активностью с поправкой на медленную инактивацию фермента. Найденная опытным путем степень инактивации GSTP1-1 в выбранных условиях была практически постоянной (15–20% за 2 ч связывания). Некоторые допущения, использованные при расчетах, излагаются ниже. Экспериментальные кривые аппроксимировали гиперболой, согласно уравнению Лэнгмюра [21].

Выделение и очистка GSTP1-1 из гемолизата эритроцитов. Осадок эритроцитов из 50 мл крови здорового донора, полученный и промытый по стандартной методике [24], подвергали гемолизу 1 ч при 0 °С в 4 объемах 10 мМ КФБ (pH 6,5). Гемолизат осветляли центрифугированием 1 ч при 27000 *g* и 4 °С. Супернатант (исходный материал для выделения GSTP1-1) наносили на колонку с DEAE-сефарозой (1,5×16 см), уравновешенную 20 мМ КФБ (pH 6,5). Хроматографию вели при 7 °С со скоростью 18 мл/ч, контролируя поглощение элюата при 280 нм проточным детектором Uvicord SII («LKB», Швеция). Колонку промывали тем же буфером до полного удаления Hb. GSTP1-1 элюировали линейным градиентом концентрации КФБ в интервале значений 20–200 мМ. Фракции с высокой активностью фермента объединяли, концентрировали и обессоливали в центрифужных фильтрах Amicon Ultra-15 «Merck-Millipore» (Германия) с молекулярно-массовым пределом задерживания 10 кДа. Для дальнейшей очистки использовали пластиковый картридж, изготовленный из мини-колонки с внутренним диаметром 1,5 см. На пористое дно картриджа помещали 16 мембранных дисков Cell-SG-A того же диаметра с суммарной толщиной ~ 2,4 см; сверху герметично вставляли адаптер для подачи жидкости перистальтическим насосом. Частично очищенный препарат GSTP1-1 в ~ 3 мл 20 мМ КФБ (pH 6,5) прокачивали через картридж 3 ч в режиме рециклинга со скоростью 12 мл/ч. Далее картридж промывали тем же буфером и им же с добавкой 0,2 М KCl; GSTP1-1 конкурентно элюировали при pH 8,8 щелочным буфером, содержащим 50 мМ tris и 20 мМ GSH. Лучшие фракции объединяли, концентрировали и обессоливали, как описано выше, после чего насыщали аргоном и хранили в закрытой пробирке при pH 6,5 и 0 °С.

Определение активности GSTP1-1. Активность фермента в реакции конъюгации GSH и CDNB определяли при pH 6,5 и 25 °C спектрофотометрическим методом [25]. Полная реакционная смесь в опытной кювете имела объем 2,5 мл и содержала 0,1 М КФБ без добавки DTT, 0,5–50 мкл анализируемой пробы, 2 мМ GSH и 1 мМ CDNB. В контрольной кювете пробу заменяли равным объемом КФБ. После прединкубации 10 мин реакцию запускали добавлением 50 мМ растворов субстратов. CDNB вносили из этанольного раствора; конечная концентрация этанола составляла 2%. Накопление продукта реакции в опытной кювете контролировали по росту поглощения при 340 нм в течение первых 4–5 мин. Измерения проводили ежеминутно на двухлучевом спектрофотометре Specord M40 («Carl Zeiss Jena», Германия); при этом автоматически вычитается вклад неферментативной реакции между GSH и CDNB в контрольной кювете. Начальную скорость реакции рассчитывали на линейном участке кинетической кривой, используя величину молярного инкремента экстинкции $\Delta\varepsilon$ = 9,6 $мМ^{-1}{\cdot}см^{-1}$. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль S-(2,4-динитрофенил) глутатиона/мин.

В кинетических экспериментах активность GSTP1-1 определяли аналогичным способом. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре SpectraMax i3 («Molecular Devices», США) в 24-луночном планшете, уменьшив объем реакционной смеси до 2 мл. Концентрацию GSH варьировали в диапазоне 0,1–2 мМ на фоне 1 мМ CDNB, а концентрацию CDNB – в диапазоне 0,05–2 мМ на фоне 2 мМ GSH. Очищенную GSTP1-1 брали в количестве 15 мЕд/лунку (вариация по GSH) или 20 мЕд/лунку (вариация по CDNB). Концентрация этанола в среде инкубации не превышала 4%, что не влияет на активность фермента. Каждую пробу анализировали в трех повторностях. Найденные значения начальных скоростей выражали в Ед активности. Для расчета параметров стационарной кинетики использовали уравнение Михаэлиса – Ментен, линеаризованное по Хейнсу [26]:

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}}[S],$$

где $[S]$ – начальная концентрация субстрата, V – начальная скорость реакции, K_m – константа Михаэлиса, $V_{\max}$ – максимальная скорость реакции. Величину каталитической константы k_{cat} находили делением параметра $V_{\max}$ на молярное количество фермента, взятого в опыт. Математическую обработку результатов осуществляли в программе SigmaPlot.

Аналитические методы. Гель-электрофорез белковых фракций проводили на приборе Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad», США) по методу Лэммли [27] в 13%-ном полиакриламидном геле на фоне SDS и 2-меркаптоэтанола. Белковые полосы в гелях окрашивали красителем Coomassie R-250. Масс-спектры очищенной GSTP1-1 регистрировали в режиме ионизации MALDI с помощью времяпролетного масс-спектрометра Microflex LRF System («Bruker Daltonics», США). Концентрацию белка определяли методом Бредфорд [28], используя раствор HSA для построения калибровочной кривой.

Результаты и их обсуждение. Специальные сорта бумаги для хроматографии и блоттинга, изготовленные из высокоочищенной целлюлозы, в последнее время находят растущее применение как перспективный исходный материал для получения мембран с ковалентно иммобилизованными биомолекулами. Достоинствами целлюлозных мембран являются невысокая стоимость, биосовместимость, биодеградабельность, пористость, эластичность, гидрофильность, а также наличие реакционноспособных гидроксильных групп; к недостаткам относится ограниченная механическая и химическая стойкость [29]. Гидроксильные группы мембран ранее активировали N,N′-карбонилдиимидазолом, BDGE [17, 18], ECH [21] или солями арилдиазония [29] с последующей иммобилизацией лигандов через аминогруппу. В настоящей работе активацию проводили реагентами, при помощи которых можно синтезировать алифатический линкер с концевой эпоксидной или винилсульфоновой группой, способной избирательно присоединять тиольные нуклеофилы в присутствии аминов при нейтральных значениях pH. Необходимость селективной иммобилизации GSH за тиольную группу обусловлена участием свободной α-аминогруппы трипептида в образовании комплекса с GST [19]. Чтобы увеличить количество иммобилизованного

лиганда, все мембраны синтезировали на основе бумаги GB003 с повышенной толщиной (0,8 мм в сухом состоянии и 1,5 мм во влажном).

В результате химической модификации исходной бумаги синтезированы глутатионсодержащие аффинные мембраны 4 типов (Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D) с различной длиной и структурой линкера между привитым лигандом и поверхностью носителя (рис. 1). Физико-химические и адсорбционные свойства полученных мембран приведены в табл. 1. Концентрация иммобилизованного GSH убывает в ряду Cell-SG-A > Cell-SG-D ≥ Cell-SG-B > Cell-SG-C, что свидетельствует о более эффективной активации носителя AGE по сравнению с другими реагентами. С учетом толщины влажной мембраны объемная концентрация трипептида на мембранах Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D соответственно равна 38,7, 26,7, 11,3 и 28,0 мкмоль/мл. По данному показателю мембраны не уступают коммерческой GSH-агарозе («Sigma-Aldrich», США), содержащей 10–30 мкмоль GSH/мл уплотненного геля, а мембрана Cell-SG-A несколько превосходит упомянутый гель.

Таблица 1. **Физико-химические и адсорбционные свойства мембран Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D**

Table 1. **Physico-chemical and adsorption properties of Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C and Cell-SG-D membranes**

Мембрана	Концентрация GSH, мкмоль/см^2	Длина линкера, Å	K_d, мкМ
Cell-SG-A	5,8	6,7	5,5 ± 1,4
Cell-SG-B	4,0	2,5	10,2 ± 2,2
Cell-SG-C	1,7	11,1	6,8 ± 1,5
Cell-SG-D	4,2	5,5	7,2 ± 1,4

П р и м е ч а н и е. Значения K_d приведены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка для 2 независимых определений.

При изучении равновесной бэтч-адсорбции GSTP1-1 на полученных мембранах концентрацию свободного (несвязавшегося) фермента находили из величины его активности, сделав обоснованные допущения: 1) в используемых низких концентрациях растворы GSTP1-1 содержат преимущественно мономер с молекулярной массой 23225 Да [30]; 2) за 2 ч инкубации при 10 °C GSTP1-1 во всех пробах одного эксперимента инактивируется в одинаковой степени; 3) с учетом предварительной обработки мембран BSA неспецифическое связывание фермента практически отсутствует; 4) инактивированная GSTP1-1 имеет серьезные нарушения конформации [31] и не обладает сродством к GSH. Обнаружено, что для всех мембран экспериментальные изотермы адсорбции GSTP1-1 (рис. 2) хорошо аппроксимируются уравнением Лэнгмюра:

$$q = \frac{Q_{\max} \cdot C}{K_d + C},$$

где q – количество связавшейся GSTP1-1, нмоль/см^2; $Q_{\max}$ – максимальная адсорбционная емкость, нмоль/см^2; C – концентрация внесенной GSTP1-1, мкМ; K_d – константа диссоциации комплекса GSTP1-1 с иммобилизованным GSH, мкМ.

Значения параметра K_d, рассчитанные по данному уравнению, приведены в табл. 1. Кривые гиперболической регрессии на рис. 2 имеют коэффициент детерминации $R^2 \geq 0{,}99$. Из полученных результатов следует, что при связывании GSTP1-1 аффинными мембранами всех типов образуется монослой не взаимодействующих молекул адсорбата. Наиболее прочным связыванием обладают мембраны Cell-SG-A с минимальным значением K_d. В целом найденные величины K_d (5–10 мкМ) указывают на высокое сродство GSTP1-1 к иммобилизованному GSH при низкой ионной силе раствора (25 мМ КФБ), когда в полной мере реализуются электростатические взаимодействия между трипептидом и связывающим его G-сайтом фермента. Литературные значения K_d комплекса GSTP1-1 с растворенным GSH в 100 мМ КФБ существенно больше (120–130 мкМ [32]), что отчасти можно объяснить некоторой дестабилизацией комплекса при более высокой ионной силе раствора. Кроме того, амфифильный линкер может повышать сродство иммобили-

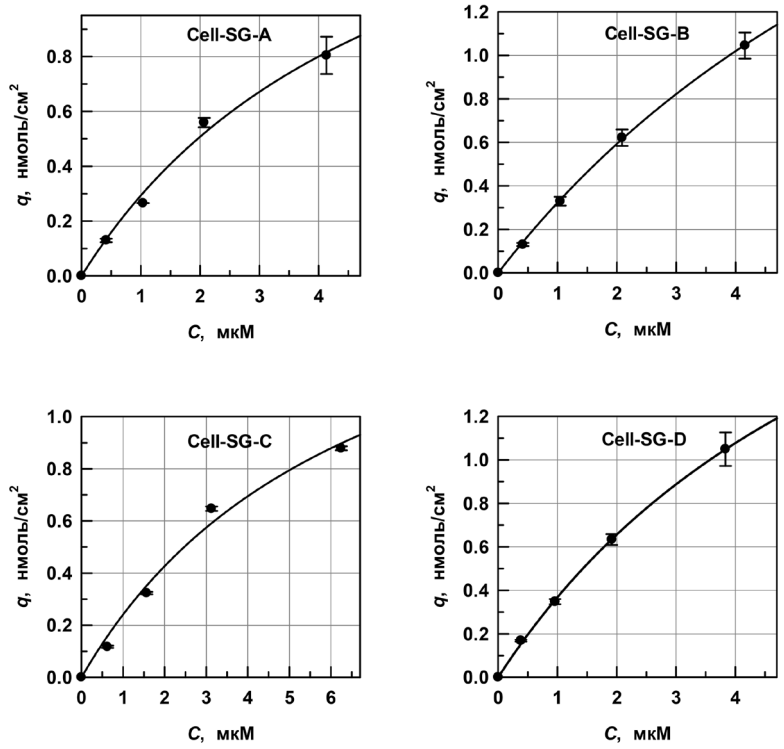


Рис. 2. Изотермы адсорбции GSTP1-1 на мембранах Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D

Fig. 2. GSTP1-1 adsorption isotherms on Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C and Cell-SG-D membranes

зованного лиганда к GSTP1-1 путем образования дополнительных контактов с H-сайтом фермента, связывающим CDNB и другие гидрофобные косубстраты. В пользу данного предположения свидетельствует намного более прочное связывание ферментом S-алкильных производных GSH, для которых значения K_d составляют 1,5–14,3 мкМ [33], что согласуется с результатами настоящей работы. У изучаемых мембран длина линкера варьирует от 2,5 (Cell-SG-B) до 11,1 Å (Cell-SG-C, табл. 1). Из сопоставления данного параметра с величиной K_d следует, что линкер длиной не менее 5,5 Å обеспечивает более прочное взаимодействие с H-сайтом GSTP1-1. Известный конкурентный ингибитор фермента S-гексилглутатион, часто используемый в аффинной хроматографии, содержит гексильный радикал длиной 5,9 Å. Полученные результаты также коррелируют с данными работы [34], согласно которым линкер протяженностью 6,3 Å между носителем (стекло с контролируемым размером пор) и иммобилизованным GSH является оптимальным для прочного и селективного связывания родственного фермента – GST μ-класса. В дальнейшей работе использовали мембраны Cell-SG-A, лучшие по совокупности физико-химических и адсорбционных свойств.

Препаративное разделение гемоглобина и GSTP1-1 на первой стадии очистки фермента проводили с помощью анионообменной DEAE-сефарозы при pH 6,5, когда молекулы указанных белков разноименно заряжены. При нанесении осветленного гемолизата на колонку с DEAE-сефарозой и последующей промывке 20 мМ КФБ обнаружено, что анионообменник связывает GSTP1-1 и некоторую часть примесных белков, но практически не взаимодействует с гемоглобином. В материале, не связавшемся с DEAE-сефарозой, также найдено < 2% исходной активности, по-видимому, принадлежащей изоформам GST других классов (α, μ и θ) с более высоким значением изоэлектрической точки. Предварительный поиск оптимального способа элюции GSTP1-1 из колонки показал, что наилучший результат дает линейный градиент концентрации КФБ (20–200 мМ). В объединенных фракциях элюата найдено 94,7 % исходной активности, а степень очистки фермента на данной стадии возрастает в 241 раз (табл. 2). Анионообменная хроматография гемолизата, в отличие от катионообменной [7, 11], позволяет повысить эффективность очистки GSTP1-1 и использовать колонку намного меньшего размера, что ускоряет хроматографический процесс и снижает потери активности фермента.

Таблица 2. **Типичная схема очистки GSTP1-1 из гемолизата эритроцитов**

Table 2. **Typical scheme for GSTP1-1 purification from erythrocyte hemolysate**

Стадия очистки	Белок, мг	Активность, Ед	Удельная активность, Ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Осветленный гемолизат	6412	28,41	0,00443	1	100
DEAE-сефароза (обессоленный концентрат)	25,22	26,90	1,067	241	94,7
Аффинный картридж (обессоленный концентрат)	0,208	21,74	104,5	23589	76,5

Невысокая удельная активность частично очищенной GSTP1-1 коррелирует с результатами гель-электрофореза, согласно которым в препарате почти нет гемоглобина, но количественно преобладают другие примесные белки (рис. 3, трек *b*). Дальнейшую очистку препарата проводили на картридже с аффинными мембранами Cell-SG-A.

Как выяснилось, при нанесении на картридж обессоленного концентрата рециклинг является необходимой операцией и обеспечивает связывание > 95% активности, так как фермент сравнительно медленно адсорбируется аффинными мембранами. Динамическое адсорбционное равновесие устанавливается за 3 ч, что легко контролировать по прекращению циклических колебаний и выходу на плато кривой поглощения элюата при 280 нм на элюционном профиле (рис. 4). Медленная аффинная адсорбция GSTP1-1 ранее отмечена в работе [10], где GSH-агарозу оставляли в контакте с ферментом на 24 ч, чтобы увеличить полноту связывания. В процессе оптимизации метода установлено, что сокращение времени рециклинга на картридже до одного часа снижает долю связавшейся GSTP1-1 до 90%. Если вместо картриджа использовать колонку с GSH-сефарозой большего объема (1×8 см) и провести аналогичный рециклинг наносимого материала в течение 3 ч, то доля связавшегося фермента падает до 70–80%. Это указывает на лучшую стерическую доступность иммобилизованного лиганда на мембранах Cell-SG-A по сравнению с гелем GSH-агарозы. После отмывки картриджа от примесных белков связанная GSTP1-1 конкурентно элюируется раствором GSH (pH 8,8) в виде острого пика активности на элюционном профиле, которому соответствует малоинтенсивный пик A_{280} (рис. 4). Заключительный подъем величины A_{280} на плато вызван собственным поглощением элюента. Высокая эффективность очистки фермента на стадии аффинной хроматографии иллюстрируется возрастанием его удельной активности на 2 порядка (табл. 2).

В результате двухстадийной хроматографической очистки нами получен препарат GSTP1-1 с общим выходом 76,5% от исходной активности в гемолизате. Степень очистки фермента составляет 23589 раз, а удельная активность, измеренная в стандартных условиях, – 104,5 Ед/мг (табл. 2). В отдельных циклах выделения удельная активность достигает 125,5 Ед/мг. По сведениям литературы, выходы очищенной GSTP1-1 из эритроцитов варьируют от 11 до 53%, а удельная активность препаратов не превышает 66 Ед/мг [8, 10, 11]. Для GSTP1-1 из плаценты после 5 хроматографических стадий очистки выход составляет 23,6%, а удельная активность равна 105 Ед/мг [35], что совпадает с данными табл. 2. Следовательно, метод очистки эритроцитарной GSTP1-1, предложенный в настоящей работе, превосходит ранее известные как по выходу, так и по удельной активности очищенного фермента, величина которой не уступает эталонным характеристикам GSTP1-1 из плаценты.

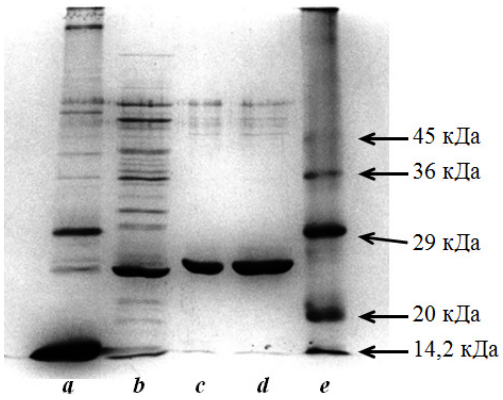


Рис. 3. Гель-электрофореграммы стадий очистки GSTP1-1. Обозначения треков: *a* – гемолизат; *b* – препарат фермента после DEAE-сефарозы; *c*, *d* – очищенный фермент (2 и 4 мкг белка); *e* – маркерные белки с указанием молекулярной массы

Fig. 3. Gel electrophoregrams of GSTP1-1 purification steps. Track designations: *a* – hemolysate; *b* – enzyme preparation after DEAE sepharose; *c*, *d* – purified enzyme (2 and 4 μg of protein); *e* – marker proteins with molecular mass indicated

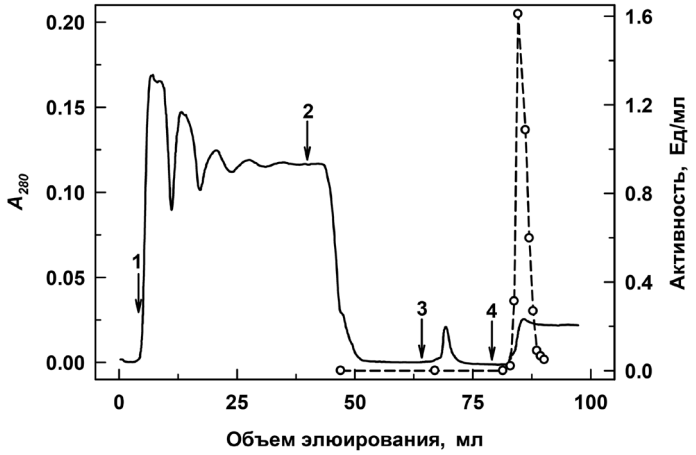


Рис. 4. Элюционный профиль хроматографии частично очищенной GSTP1-1 на картридже с мембранами Cell-SG-A. Сплошная линия – A_{280} (поглощение элюата при 280 нм); штриховая – активность фермента. Стрелками указаны: *1* – начало рециклинга; *2* – окончание рециклинга и промывка КФБ; *3* – промывка КФБ + 0,2 М KCl; *4* – элюция (50 мМ tris + 20 мМ GSH, pH 8,8)

Fig. 4. Chromatography elution profile of partially purified GSTP1-1 on a cartridge with Cell-SG-A membranes. Solid line – A_{280} (eluate absorption at 280 nm); dashed line – enzyme activity. Arrows show: *1* – start of recycling; *2* – end of recycling and washing with potassium phosphate buffer; *3* – washing with potassium phosphate buffer + 0.2 M KCl; *4* – elution (50 мМ tris + 20 мМ GSH, pH 8.8)

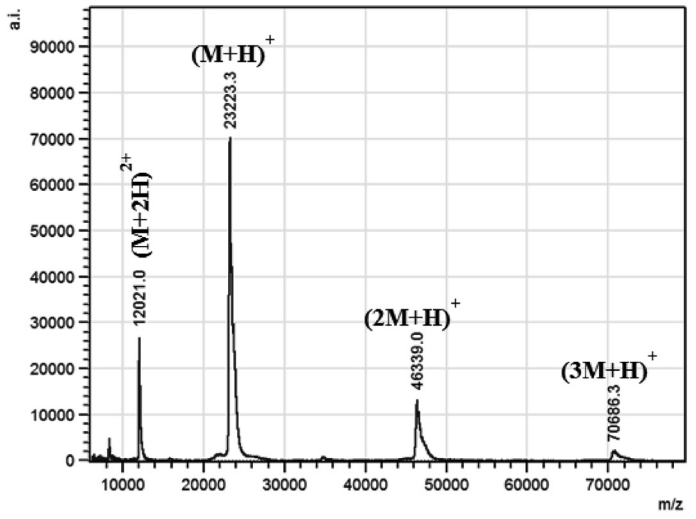


Рис. 5. Масс-спектр (MALDI-TOF) очищенного препарата GSTP1-1

Fig. 5. Mass spectrum (MALDI-TOF) of the purified GSTP1-1 preparate

По данным гель-электрофореза, чистота полученного препарата GSTP1-1 составляет не менее 95%, а электрофоретическая подвижность основной белковой зоны соответствует ожидаемой молекулярной массе 23–24 кДа (рис. 3, треки *c* и *d*). Гомогенность очищенного фермента также подтверждена масс-спектрометрией MALDI-TOF (рис. 5). Наряду с главным пиком протонированного молекулярного иона $(M+H)^+$ с величиной m/z = 23223 в спектре имеются минорные пики, соответствующие дважды протонированной молекуле $(M+2H)^{2+}$, а также протонированным ди- и тримерным молекулярным ассоциатам $(2M+H)^+$ и $(3M+H)^+$. Сигналы от примесных белков практически отсутствуют. Экспериментальное значение молекулярной массы, найденное масс-спектрометрическим методом, равно 23222 Да, что с точностью 3 Да соответствует расчетной массе 23225 Да для доминирующего аллеля GSTP1a, содержащего аминокислотные остатки Ile105 и Ala114 [1].

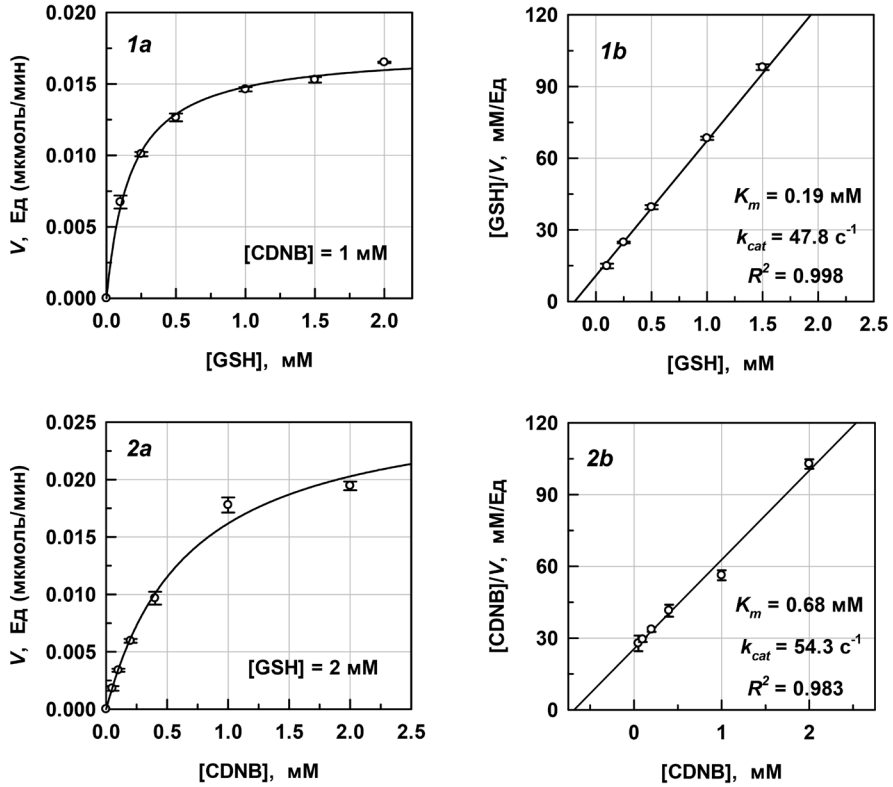


Рис. 6. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции *V* от концентрации GSH (*1*) и CDNB (*2*): *a* – первичные гиперболические кривые; *b* – графики Хейнса. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение для 3 повторностей

Fig. 6. Dependence of initial enzymatic reaction rate *V* on GSH (*1*) and CDNB (*2*) concentration: *a* – primary hyperbolic curves; *b* – Hanes plots. Results are given as average ± standard deviation for 3 repeats

Мембраны Cell-SG-A могут многократно (не менее 5 раз) использоваться для очистки фермента без потери хроматографических свойств и являются намного более экономичным и удобным в работе аффинным адсорбентом по сравнению с GSH-агарозой. В то же время аффинные мембраны, как и агарозные гели, не обладают достаточной механической прочностью для жидкостной хроматографии высокого давления.

При изучении каталитических свойств очищенной GSTP1-1 исходили из ранее предложенного [36] последовательного механизма действия фермента с неупорядоченным присоединением субстратов (GSH и CDNB) и быстрым установлением равновесия. Параметры стационарной кинетики определяли общепринятым для двухсубстратных реакций методом, варьируя начальную концентрацию одного из субстратов при фиксированной начальной концентрации второго субстрата. Установлено, что для каждого субстрата экспериментальная зависимость начальной скорости реакции от его концентрации описывается гиперболой согласно уравнению Михаэлиса – Ментен (рис. 6). Линеаризацию гиперболических кривых проводили в координатах Хейнса, что приводит к меньшей погрешности в расчетах по сравнению с часто используемым графиком Лайнуивера–Берка [26]. Найденные величины параметра K_m по GSH (0,19 мМ) и CDNB (0,68 мМ) в целом согласуются с ранее опубликованными данными (соответственно 0,07–0,5 мМ и 0,70–2,1 мМ [7, 10, 35-37]). Анализируя большой разброс литературных значений K_m по GSH, следует отметить, что в норме концентрация эритроцитарного GSH составляет 1–2 мМ [38]. В связи с этим найденная нами величина не слишком мала по сравнению с уровнем GSH и позволяет рационально объяснить физиологически значимое снижение активности фермента при уменьшении концентрации GSH (например, в условиях окислительного стресса). По величине параметра k_{cat} для GSH (47,8 с$^{-1}$) и CDNB (54,3 с$^{-1}$) очищенная GSTP1-1 превосходит аналогичные характеристики ранее выделенных препаратов (соответственно 8,8–43,0 и 18,3–32,9 с$^{-1}$ [8, 10, 39]), что коррелирует с более высокой удельной активностью фермента.

Заключение. В настоящей работе впервые получены и охарактеризованы глутатионсодержащие аффинные мембраны 4 типов на основе химически модифицированной целлюлозной бумаги. Мембраны Cell-SG-A успешно использованы для очистки GSTP1-1 вместо традиционных агарозно-гелевых адсорбентов. Разработан новый метод выделения и очистки изоформы P1-1 из гемолизата эритроцитов, включающий предварительное удаление гемоглобина на анионообменнике и аффинную хроматографию фермента на картридже с мембранами Cell-SG-A. По данным гель-электрофореза и масс-спектрометрии MALDI-TOF, чистота полученного препарата составляет не менее 95%. Определены кинетические параметры очищенной GSTP1-1 в реакции конъюгации GSH и CDNB при pH 6,5 и 25 °C.

По эффективности (выход фермента 76,5%, степень очистки 23589 раз, удельная активность 104,5 Ед/мг белка) предложенный метод очистки эритроцитарной GSTP1-1 превосходит ранее известные, что представляет интерес для исследователей, занятых направленным синтезом новых ингибиторов фермента с противоопухолевой активностью. Результаты работы также могут найти применение при очистке нативных и рекомбинантных изоформ GST из различных источников и гибридных белков с GST-доменом.

Список использованных источников

1. Hayes, J. D. Glutathione transferases / J. D. Hayes, J. U. Flanagan, I. R. Jowsey // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – Vol. 45. – P. 51–88.

2. Laborde, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death / E. Laborde // Cell Death Differ. – 2010. – Vol. 17, № 9. – P. 1373–1380.

3. Oakley, A. Glutathione transferases: a structural perspective / A. Oakley // Drug Metab. Rev. – 2011. – Vol. 43, №2. – P. 138–151.

4. Townsend, D. M. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance / D. M. Townsend, K. D. Tew // Oncogene. – 2003. – Vol. 22, № 47. – P. 7369–7375.

5. Erythrocyte glutathione transferase: a novel biomarker to check environmental pollution hazardous for humans / R. Fabrini [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – Vol. 426, № 1. – P. 71–75.

6. Dissociation of a new glutathione S-transferase activity in human erythrocytes / K. R. Schröder [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 1992. – Vol. 43, № 8. – P. 1671–1674.

7. The human glutathione S-transferases. Studies on the kinetic, stability and inhibition characteristics of the erythrocyte enzyme / P. A. Hirrell [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – Vol. 913, № 1. – P. 92–96.

8. Awasthi, Y. C. Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferase from human erythrocytes / Y. C. Awasthi, S. V. Singh // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – Vol. 125, № 3. – P. 1053–1060.

9. Howie, A. F. Purification of acidic glutathione S-transferases from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement / A. F. Howie, J. D. Hayes, G. J. Beckett // Clin. Chim. Acta. – 1988. – Vol. 177, № 1. – P. 65–76.

10. Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: a comparative study / R. R. Hamed [et al.] // Res. Dev. Disabil. – 2011. – Vol. 32, № 5. – P.1470–1482.

11. Marcus, C. J. Glutathione transferase from human erythrocytes. Nonidentity with the enzymes from liver / C. J. Marcus, W. H. Habig, W. B. Jakoby // Arch. Biochem. Biophys. – 1978. – Vol. 188, № 2. – P. 287–293.

12. Electron paramagnetic resonance identification of a highly reactive thiol group in the proximity of the catalytic site of human placenta glutathione transferase / A. Desideri [et al.] // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266, № 4. – P. 2063–2066.

13. Vander Jagt, D. L. Purification and bilirubin binding properties of glutathione S-transferase from human placenta / D. L. Vander Jagt, S. P. Wilson, J. E. Heidrich // FEBS Lett. – 1981. – Vol. 136, № 2. – P. 319–321.

14. Cytoplasmic and periplasmic production of human placental glutathione transferase in *Escherichia coli* / A. Battistoni [et al.] // Protein Expr. Purif. – 1995. – Vol. 6, № 5. – P. 579–587.

15. High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA // R. H. Kolm [et al.] // Protein Expr. Purif. – 1995. – Vol. 6, № 3. – P. 265–271.

16. Zou, H. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins / H. Zou, Q. Luo, D. Zhou // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2001. – Vol. 49, № 1–3. – P. 199–240.

17. Гилевич, С. Н. Аффинные мембраны на основе химически модифицированной целлюлозы для избирательной твердофазной экстракции белков / С. Н. Гилевич, Е. Ю. Завизион // Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т химии новых материалов; науч. ред. В. Е. Агабеков, Е. В. Королева, К. Н. Гусак. – Минск, 2011. – С. 305–319.

18. Гилевич, С. Н. Получение и гемоглобинсвязывающие свойства металлоаффинных мембран на основе химически модифицированной хроматографической бумаги / С. Н. Гилевич, Е. Ю. Завизион // Химия, структура и функция биомолекул: материалы IV Междунар. конф., Минск, 17–19 окт. 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси; редкол.: С. А. Усанов [и др.]. – Минск, 2012. – С. 46–47.

19. Forde, G. M. Preparation, analysis and use of an affinity adsorbent for the purification of GST fusion protein / G. M. Forde // Methods Mol. Biol. – 2008. – Vol. 421. – P. 125–136.

20. Burton, S. C. High-density ligand attachment to brominated allyl matrices and application to mixed mode chromatography of chymosin / S. C. Burton, D. R. K. Harding // J. Chromatogr. A. – 1997. – Vol. 775, № 1–2. – P. 39–50.

21. Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies / Y. M. Ke [et al.] // Process Biochem. – 2010. – Vol. 45, № 4. – P. 500–506.

22. Scoble, J. A. Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimisation of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions / J. A. Scoble, R. K. Scopes // J. Chromatogr. A. – 1996. – Vol. 752, № 1–2. – P. 67–76.

23. Friedman, M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences / M. Friedman // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52, № 3. – P. 385–406.

24. The Molecular Mechanism of Autoxidation for Human Oxyhemoglobin / M. Tsuruga [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, № 15. – P. 8607–8615.

25. Habig, W. H. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby // J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249, № 22. – P. 7130–7139.

26. Bisswanger H. Practical Enzymology / H. Bisswanger – 2nd Ed. – Weinheim: Wiley-Blackwell, 2011. – 378 p.

27. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.

28. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, № 1–2. – P. 248–254.

29. A one-step and biocompatible cellulose functionalization for covalent antibody immobilization on immunoassay membranes / J. Credou [et al.] // J. Mater. Chem. B. – 2013. – Vol. 1, № 26. – P. 3277–3286.

30. Catalytically active monomer of glutathione S-transferase pi and key residues involved in the electrostatic interaction between subunits / Y. C. Huang [et al.] // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, № 47. – P. 32880–32888.

31. Inactivation of human salivary glutathione transferase P1-1 by hypothiocyanite: a post-translational control system in search of a role / R. Fabrini [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 11. – e112797.

32. Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination / R. Fabrini [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48, № 43. – P. 10473–10482.

33. Study of chromatographic parameters for glutathione S-transferases on an high-performance liquid chromatography affinity stationary phase / J. B. Wheatley [et al.] // J. Chromatogr. A. – 1994. – Vol. 676, № 1. – P. 81–90.

34. Effect of linker for immobilization of glutathione on BSA-assembled controlled pore glass beads / L.-H. Chen [et al.] // Bull. Korean Chem. Soc. – 2004. – Vol. 25, № 9. – P. 1366–1370.

35. Mannervik, B. Glutathione Transferase (Human Placenta) / B. Mannervik, C. Guthenberg // Meth. Enzymol. – 1981. – Vol. 77. – P. 231–235.

36. Thumser, A. E. Kinetic mechanism of human erythrocyte acidic isoenzyme ρ / A. E. Thumser, K. M. Ivanetich // Biochim. Biophys. Acta. – 1993. – Vol. 1203, № 1. – P. 115–120.

37. Studies on the variability of glutathione S-transferase from human erytrocytes / R. C. Strange [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 1982. – Vol. 120, № 2. – P. 251–260.

38. Forman, H. J. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna // Mol. Aspects Med. – 2009. – Vol. 30, № 1–2. – P. 1–12.

39. Purification of glutathione S-transferase pi from erythrocytes and evaluation of the inhibitory effect of hypericin / S. Turk [et al.] // Protein J. – 2015. – Vol. 34, № 6. – P. 434–443.

References

1. Hayes J. D, Flanagan J. U., Jowsey I. R., “Glutathione transferases”, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2005, vol. 45, pp. 51–88.

2. Laborde E., “Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death”, *Cell Death & Differentiation*, 2010, vol. 17, no. 9, pp. 1373–1380.

3. Oakley A., “Glutathione transferases: a structural perspective”, *Drug Metabolism Reviews*, 2011, vol. 43, no. 2, pp. 138–151.

4. Townsend D. M., Tew K. D., “The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance”, *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 47, pp. 7369–7375.

5. Fabrini R., Bocedi A., Del Grosso E., Morici L., Federici G., Palleschi A., Ricci G., “Erythrocyte glutathione transferase: a novel biomarker to check environmental pollution hazardous for humans”, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 2012, vol. 426, no. 1, pp. 71–75.

6. Schröder K. R., Hallier E., Peter H., Bolt H. M., “Dissociation of a new glutathione S-transferase activity in human erythrocytes”, *Biochemical Pharmacology*, 1992, vol. 43, no. 8, pp. 1671–1674.

7. Hirrell P. A., Collins M. F., Nimmo I. A., Strange R. C., “The human glutathione S-transferases. Studies on the kinetic, stability and inhibition characteristics of the erythrocyte enzyme”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, vol. 913, no. 1, pp. 92–96.

8. Awasthi Y. C., Singh S. V., “Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferase from human erythrocytes”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, vol. 125, no. 3, pp. 1053–1060.

9. Howie A. F., Hayes J. D., Beckett G. J., “Purification of acidic glutathione S-transferases from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement”, *Clinica Chimica Acta*, 1988, vol. 177, no. 1, pp. 65–76.

10. Hamed R. R., Maharem T. M., Abdel-Meguid N., Sabry G. M., Abdalla A.-M., Guneidy R. A., "Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: a comparative study", *Research In Developmental Disabilities*, 2011, vol. 32, no. 5, pp. 1470–1482.

11. Marcus C. J., Habig W. H., Jakoby W. B., "Glutathione transferase from human erythrocytes. Nonidentity with the enzymes from liver", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1978, vol. 188, no. 2, pp. 287–293.

12. Desideri A., Caccuri A. M., Polizio F., Bastoni R., Federici G., "Electron paramagnetic resonance identification of a highly reactive thiol group in the proximity of the catalytic site of human placenta glutathione transferase", *Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266, no. 4, pp. 2063–2066.

13. Vander Jagt D. L., Wilson S. P., Heidrich J. E., "Purification and bilirubin binding properties of glutathione S-transferase from human placenta", *FEBS Letters*, 1981, vol. 136, no. 2, pp. 319–321.

14. Battistoni A., Mazzetti A. P., Petruzzelli R., Muramatsu M., Federici G., Ricci G., Lo Bello M., "Cytoplasmic and periplasmic production of human placental glutathione transferase in Escherichia coli", *Protein expression and purification*, 1995, vol. 6, no. 5, pp. 579–587.

15. Kolm R. H., Stenberg G., Widersten M., Mannervik B., "High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA", *Protein expression and purification*, 1995, vol. 6, no. 3, pp. 265–271.

16. Zou H., Luo Q., Zhou D., "Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2001, vol. 49, no. 1-3, pp. 199-240.

17. Gilevich S. N., Zavizion E. Yu., "Affinity membranes on the basis of chemically modified cellulose for selective solid-phase protein extraction", *Trudy XXIII Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii "Khimicheskie reaktivy, reagenty i protsessy malotonnazhnoi khimii", 27–29 oktiabria 2010 goda, Minsk* [Proc. XXIII Int. Conf. "Chemical reactants, reagents and processes of low-tonnage chemistry", October 27–29, 2010, Minsk], Belaruskaia navuka, Minsk, BY, 2011, pp. 305–319.

18. Gilevich S. N., Zavizion E. Yu., "Preparation and hemoglobin-binding properties of immobilized metal affinity membranes based on chemically modified chromatographic paper", *Sbornik dokladov IV Mezhdunarodnoi konferentsii "Khimiya, struktura i funktsiya biomolekul", 17–19 oktiabria 2012 g., Belarus', Minsk* [Collection of reports IV International conference "Chemistry, structure and function of biomolecules", 17–19 October 2012, Belarus, Minsk], Minsk, BY, 2012, pp. 46–47.

19. Forde G. M., "Preparation, analysis and use of an affinity adsorbent for the purification of GST fusion protein", *Methods in Molecular Biology*, 2008, vol. 421, pp. 125–136.

20. Burton S. C., Harding D. R. K., "High-density ligand attachment to brominated allyl matrices and application to mixed mode chromatography of chymosin", *Journal of Chromatography A*, 1997, vol. 775, no. 1–2, pp. 39–50.

21. Ke Y. M., Chen C. I., Kao P. M., Chen H. B., Huang H. C., Yao C. J., Liu Y. C., "Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies", *Process biochemistry*, 2010, vol. 45, no. 4, pp. 500–506.

22. Scoble J. A., Scopes R. K., "Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimisation of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions", *Journal of Chromatography A*, 1996, vol. 752, no. 1–2, pp. 67–76.

23. Friedman M., "Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no. 3, pp. 385–406.

24. Tsuruga M., Matsuoka A., Hachimori A., Sugawara Y., Shikama K., "The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin", *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 15, pp. 8607–8615.

25. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B., "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation", *Journal of Biological Chemistry*, 1974, vol. 249, no. 22, pp. 7130–7139.

26. Bisswanger H., *Practical Enzymology*, 2nd ed., Wiley-Blackwell, Weinheim, DE, 2011.

27. Laemmli U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, p. 680–685.

28. Bradford M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no 1–2, pp. 248–254.

29. Credou J., Volland H., Danob J., Berthelot T., "A one-step and biocompatible cellulose functionalization for covalent antibody immobilization on immunoassay membranes", *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, vol. 1, no. 26, pp. 3277–3286.

30. Huang Y., Misquitta S., Blond S. Y., Adams E., Colman R. F., "Catalytically active monomer of glutathione S-transferase pi and key residues involved in the electrostatic interaction between subunits", *Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no. 47, pp. 32880–32888.

31. Fabrini R., Bocedi A., Camerini S., Fusetti M., Ottaviani F., Passali F. M., Topazio D., Iavarone F., Francia I., Castagnola M., Ricci G., "Inactivation of human salivary glutathione transferase P1-1 by hypothiocyanite: a post-translational control system in search of a role", *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 11, e112797, doi:10.1371/journal.pone.0112797.

32. Fabrini R., De Luca A., Stella L., Mei G., Orioni B., Ciccone S., Federici G., Lo Bello M., Ricci G., "Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination", *Biochemistry*, 2009, vol. 48, no. 43, pp. 10473–10482.

33. Wheatley J. B., Hughes B., Bauer K., Schmidt D. E., "Study of chromatographic parameters for glutathione S-transferases on an high-performance liquid chromatography affinity stationary phase", *Journal of Chromatography A*, 1994, vol. 676, no. 1, pp. 81–90.

34. Chen L. H., Choi Y. S., Park Jung W., Kwon J., Wang R. S., Lee T., Ryu S. H., Park Joon W., "Effect of linker for immobilization of glutathione on BSA-assembled controlled pore glass beads", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2004, vol. 25, no. 9, pp. 1366–1370.

35. Mannervik B., Guthenberg C., "Glutathione Transferase (Human Placenta)", *Methods in Enzymology*, 1981, vol. 77, pp. 231–235.

36. Thumser A. E., Ivanetich K. M., "Kinetic mechanism of human erythrocyte acidic isoenzyme ρ", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1203, no. 1, pp. 115–120.

37. Strange R. C., Johnson P. H., Lawton A., Moult J. A., Tector M. J., Tyminski R. J., Cotton W., "Studies on the variability of glutathione S-transferase from human erythrocytes", *Clinica Chimica Acta*, 1982, vol. 120, no. 2, pp. 251–260.

38. Forman H. J., Zhang H., Rinna A., "Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis", *Molecular Aspects of Medicine*, 2009, vol. 30, no 1–2, pp. 1–12.

39. Turk S., Erkmen G. K., Dalmizrak O., Ogus I. H., Ozer N., "Purification of glutathione S-transferase pi from erythrocytes and evaluation of the inhibitory effect of hypericin", *Protein Journal*, 2015, vol. 34, no. 6, pp. 434–443.

Информация об авторах

Гилевич Сергей Нилович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail:gilevich@iboch.bas-net.by.

Бречко Юлия Владимировна – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail:julia-brechko@yandex.ru.

Рипинская Кристина Юрьевна – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kristina.ripinskaya@gmail.com.

Information about the autors

Gilevich Syargey Nilavich – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus. E-mail gilevich@iboch.bas-net.by.

Brechka Yuliya Vladimirovna – Junior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus. E-mail: julia-brechko@yandex.ru.

Ripinskaya Kristina Yur'evna – Junior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus. E-mail: kristina.ripinskaya@gmail.com.

Для цитирования

Гилевич, С. Н. Получение высокоактивной глутатион-S-трансферазы P1-1 из эритроцитов человека с помощью аффинных мембран и свойства очищенного фермента / С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко, К. Ю. Рипинская // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 66–79.

For citation

Gilevich S. N., Brechka Yu. V., Ripinskaya K. Yu. Preparation of highly active human erythrocyte glutathione S-transferase P1-1 using affinity membranes, and properties of the purified enzyme. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 66–79. (In Russian).

ISSN 0002-3590(print.)

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGENEERING

УДК 666.642.3:666.3.032.4

Поступила в редакцию 12.04.2016
Received 12.04.2016

И. А. Левицкий, С. Е. Баранцева, А. И. Позняк

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КАЧЕСТВА МАЙОЛИКОВОЙ ПОСУДЫ ПУТЕМ СОЗДАНИЯ ГАРМОНИЧНОЙ СИСТЕМЫ КЕРАМИЧЕСКАЯ МАТРИЦА – ГЛАЗУРНОЕ ПОКРЫТИЕ

Приведены результаты комплексных исследований по совершенствованию качества майоликовой посуды путем гармонизации в системе керамическая основа–глазурное покрытие. Использован современный подход к решению поставленных задач, включающий иерархическое моделирование, составной частью которого является создание структуры развития кластера, объединяющего технологические стадии получения керамической продукции требуемого качества в единое целое – процесс производства. Проведенные экспериментальные исследования, подтверждающие правильность подхода к решению поставленных задач, позволили улучшить физико-химические свойства майолики и обеспечить эксплуатационную надежность при термической обработке посуды в посудомоечных машинах различного типа.

Показано, что получение качественной майоликовой посуды базируется на гармонизации керамической основы и декоративного покрытия, поэтому созданию керамической массы и глазурных покрытий с определенным комплексом технологических и физико-химических свойств внимание должно уделяться в абсолютно равной степени, что позволяет эффективно и логически обоснованно совершенствовать технологию получения качественных майоликовых изделий.

Ключевые слова: гармонизация, кластер, дендрограмма, майолика, керамическая основа, глазурное покрытие.

I. A. Levitskii, S. E. Barantseva, A. I. Poznyak

Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

IMPROVING THE QUALITY OF MAJOLICA DISHES BY CREATING A CERAMIC MATRIX – GLAZED COATING HARMONIOUS SYSTEM

The results of comprehensive research on improving the quality of majolica ware by harmonizing in the system «ceramic base – glazed coating» are presented in the article. A modern approach to solving problems, including hierarchical modeling, part of which is to create a cluster of structures, combining the technological steps of preparing a ceramic product of the desired quality in a single entity – the technological process was used in the work. Experimental studies, confirming the correctness of this approach, have improved physicochemical properties of majolica and ensure the operational reliability during thermal processing of dishes in dishwashers of various types.

It has been shown that the production of high-quality majolica ware is based on the harmonization of the ceramic base and the decorative coating, so the development of a ceramic mass and glaze coating with a specific set of technological and physicochemical properties should be given absolutely equal attention. The above approach provides efficient and logically sound improvement of the production technology for high-quality majolica products.

Keywords: harmonization, cluster, dendrogram, majolica, ceramic base, glazed coating.

Введение. Интенсивное развитие сети общественного питания в Республике Беларусь является важнейшим условием необходимости совершенствования эксплуатационных свойств и декоративно-эстетических характеристик майоликовых изделий посудной группы при их масштабной эксплуатации и использовании посудомоечных машин достаточно высокой производительности. Из-за многократной обработки изделий струями горячей воды (45–80 ^{o}C) под давлением 0,03–1 МПа [1] к посуде предъявляются повышенные требования по показателям физико-химических свойств, а декоративные характеристики определяют статус, стиль и индивидуальность предприятий общественного питания.

© Левицкий И. А., Баранцева С. Е., Позняк А. И., 2017

Качество и уровень эксплуатационных характеристик майоликовых изделий хозяйственного назначения в современных условиях непрерывно повышается, поскольку интенсивное развитие материаловедения, а также декоративно-эстетические требования к майолике изменяются и совершенствуются. Несмотря на обилие новых видов материалов для изготовления посуды (алюминий, чугун, нержавеющая сталь, жаропрочное стекло), керамика остается востребованной, что подтверждается опытом ее использования с глубокой древности и до настоящих дней для приготовления и хранения пищевых продуктов.

Цель работы – изучение возможности улучшения физико-химических свойств и эксплуатационных характеристик майоликовых изделий путем разработки гармонизированной системы керамическая основа–декоративное глазурное покрытие.

Методология исследования. В настоящее время все более широкое распространение находит иерархическое моделирование технологических процессов получения различных видов продукции, составной частью которого, согласно основам технодинамики [2], является создание структуры развития кластера (дендрограммы), позволяющей по-новому отнестись к совершенствованию и оптимизации технологического процесса получения майоликовых изделий. Кластер объединяет любую группу объектов или явлений, в нашем случае стадий технологического процесса, которые составляют единое целое, т. е. процесс производства керамической продукции требуемого качества.

Для развития структуры кластера использовалось дерево целей – структурированный иерархический перечень, в котором цели более низкого уровня подчинены целям более высокого уровня и служат для достижения генеральной цели – получения готовой продукции с улучшенными декоративно-эстетическими характеристиками, повышенными физико-химическими свойствами и эксплуатационной надежностью, соответствующей ГОСТу 32094–2013 «Посуда майоликовая» и СанПиН 13-3 РБ-2014 «Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами». Построение дерева целей само по себе представляет методику разработки стратегии достижения поставленной генеральной цели.

Получение качественной майоликовой посуды базируется на гармонизации керамической основы и декоративного покрытия, поэтому созданию керамической массы с определенным комплексом технологических и физико-химических свойств и разработке составов прозрачных и глушеных покрытий внимание уделяется в абсолютно равной степени. Исследование проводилось в соответствии со структурой кластера (дендрограммой, рис. 1). Каждая ветвь дерева целей представляет собой последовательные стадии технологического процесса, выполнение которых приводит к достижению генеральной цели – получению декорированных прозрачной и глушеной глазурью майоликовых изделий с улучшенными эксплуатационными свойствами.

Результаты и их обсуждение. В настоящее время в Республике Беларусь большинство майоликовых изделий хозяйственно-бытового назначения изготавливается в ОАО «Белхудожкерамика» (г. п. Радошковичи, Минская область). Технология их производства базируется на использовании в составе 100 мас.%* легкоплавкой неспекающейся полиминеральной глины месторождения «Гайдуковка». Полученные при максимальной температуре политого обжига 940–980 °С глазурованные изделия характеризуются высокой пористостью (30–32 %) и водопоглощением (17–18 %), что не обеспечивает требуемой эксплуатационной надежности майоликовой посуды и исключает возможность ее использования в организациях общественного питания, оснащенных посудомоечными машинами.

Детальное изучение научной и патентной литературы в данной области позволило установить, что улучшение качественных характеристик продукции, в частности снижение показателей водопоглощения и упрочнение структуры майоликовых изделий, не представляется возможным при использовании в составе масс только легкоплавких глин Республики Беларусь, в том числе месторождения «Гайдуковка».

* Здесь и далее по тексту приведено массовое содержание.

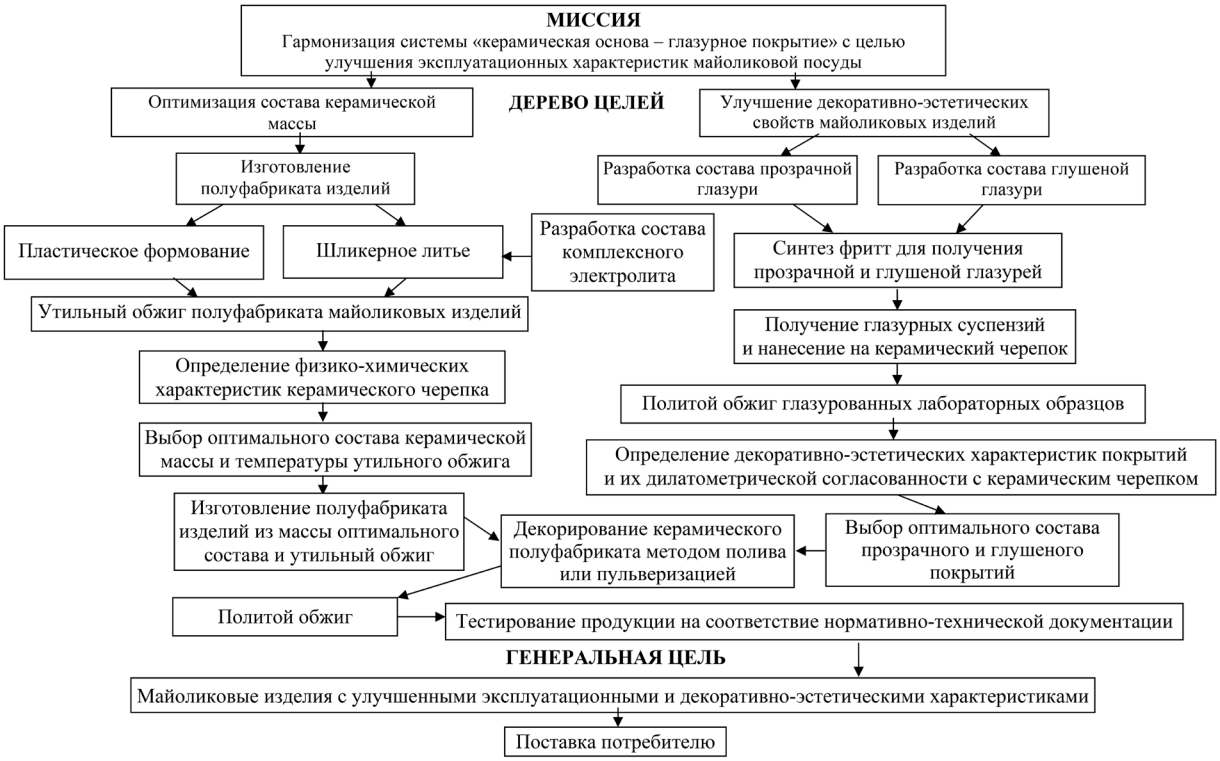


Рис. 1. Дендрограмма кластеризации

Fig. 1. The clasterization dendrogram

В связи с этим исследовалась возможность использования в качестве компонентов керамических масс глины огнеупорной марки Веско-Гранитик Веселовского месторождения, базальта Ровенского месторождения и каолина Просяновского мокрого обогащения. Химический состав сырьевых материалов приведен в табл. 1.

Таблица 1. **Усредненный химический состав сырьевых материалов**

Table 1. **Averaged chemical composition of raw materials**

Сырьевые материалы	Содержание оксидов, %								
	SiO_2	Al_2O_3	CaO	MgO	Na_2O	K_2O	Fe_2O_3	TiO_2	ппп
Глина «Гайдуковка»	53,8	12,3	9,04	3,08	0,68	2,95	5,7	0,75	11,7
Глина Веско-Гранитик	65,29	23,63	0,56	0,66	0,39	1,53	1,46	–	6,48
Базальт ровенский	52,24	17,26	7,58	2,28	3,47	0,51	13,17	2,88	0,61
Каолин просяновский	49,3	38,5	0,16	0,07	–	0,5	1,07	0,2	10,2

Выбор сырьевых материалов основывался на их химико-минеральном составе и технологических характеристиках. Так, огнеупорная глина, имеющая широкий интервал спекшегося состояния, будет способствовать его расширению для керамической массы; базальт, характеризующийся значительным содержанием оксидов щелочных металлов и железа – интенсифицировать процесс спекания; каолин – улучшать реологические характеристики шликера [3–5]. С использованием вышеуказанных компонентов разработана серия составов сырьевых композиций, в которой содержание компонентов варьировалось в следующих пределах, %: глина «Гайдуковка» – 70–85, глина Веско-Гранитик – 10–15, базальт – 5–20, каолин – 5–10.

Майоликовые изделия изготавливали из разработанных керамических масс методами пластического формования и шликерного литья. Шликер, полученный при совместном мокром помоле сырьевых компонентов в шаровой мельнице, характеризовался влажностью 40–41%, текучестью 10–12 с, коэффициентом загустевания 1,55–1,62. Полученные изделия подвергали обжигу в интервале температур 1000–1100 °С с выдержкой при максимальной температуре 1–1,5 ч.

При проведении комплексных исследований физико-химических свойств керамических образцов, полученных методом шликерного литья, выявлено, что показатели водопоглощения с увеличением содержания базальта в массе и температуры обжига монотонно снижаются с 21,9 до 11,2 %. Установлено, что по сравнению с влиянием огнеупорной глины базальт активизирует процесс спекания и улучшает свойства обожженного черепка, что объясняется наличием легкоплавких примесей в породе (вулканического стекла, анальцима, хлорофеита), снижающих температуру начала спекания и плавления. При температурах обжига 1000 и 1050 °С значения водопоглощения образцов изделий изменяются незначительно от 21,9 до 18,5 %, поскольку в данном интервале температур базальт выступает в роли отощающего компонента. При температурах обжига 1075 и 1100 °С зависимость водопоглощения от температуры проявляется значительно активнее, что связано с флюсующим действием базальта.

Увеличение содержания легкоплавкой глины месторождения «Гайдуковка» в составе керамических масс (от 70 до 85 %) приводит к повышению показателей водопоглощения образцов от 12,4 до 20,8 %, что обусловлено наличием примесных карбонатных включений. Зависимость механической прочности образцов изделий от состава масс и температуры обжига имеет обратный характер и связана с процессами спекания, происходящими при обжиге. Значения прочности при изгибе изменяются в пределах 8,1 – 15,7 МПа и имеют максимальные значения при содержании плавня 10 % и легкоплавкой глины 70 %.

Таким образом, результаты определения физико-химических свойств образцов, изготовленных методом литья с последующим обжигом в интервале 1000–1100 °С, позволили установить, что оптимальной температурой является 1100±5 °С. Однако, несмотря на обеспечение требуемых физико-химических свойств образцов изделий при этой температуре, отмечается рост общей усадки и характерное окрашивание черепка в темно-коричневые оттенки.

С целью улучшения декоративных характеристик изделий сформованный полуфабрикат подвергали термообработке при более низкой температуре обжига (1080±5 °С) и продолжительности выдержки – 1,5 ч. Анализ полученных результатов показал, что снижение максимальной температуры обжига при увеличении изотермической выдержки обеспечивает формирование плотной спеченной структуры образцов и показатели водопоглощения составляют 9,3–10,1%. При этом керамический черепок более светлый, чем полученный обжигом полуфабриката при 1100 °С, значения деформации и усадки находятся в допустимых пределах.

На рис. 2 представлено электронно-микроскопическое изображение поверхности скола керамического черепка из массы оптимального состава, которое свидетельствует, что структура образцов, полученных по оптимальному режиму обжига, однородная, плотная, с равномерным распределением по объему относительно небольшого количества пор со средним диаметром 15–30 мкм. Следует отметить, что изделия, полученные методом формования, характеризуются несколько лучшими показателями физико-химических свойств, в частности механическая прочность составляет 10,3–10,5 МПа, водопоглощение – (9,0±0,7) %.



Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение поверхности скола керамической основы оптимального состава после обжига при температуре 1080±5 °С с выдержкой 1,5 ч

Fig. 2. Electron microscope image of the optimal composition ceramic base chip surface after baking at 1080±5 °C for 1.5 h

Полученные результаты позволили сделать вывод, что жидкая фаза играет важную роль в процессе формирования структуры майоликовых изделий с улучшенными эксплуатационными характеристиками. Однако повышенное количество расплава при температуре 1100 °С может привести к снижению устойчивости изделий при обжиге, поэтому выбор оптимальных температурно-временных параметров обжига является ответственным фактором в общем подходе к решению технологических задач.

При разработке составов глазурей для майоликовых изделий, контактирующих с пищевыми средами, одним из условий являлось обеспечение широкого температурного интервала глазурообразования прозрачных некристаллизующихся покрытий и формирования стеклокристаллической структуры глушеного белого блестящего покрытия.

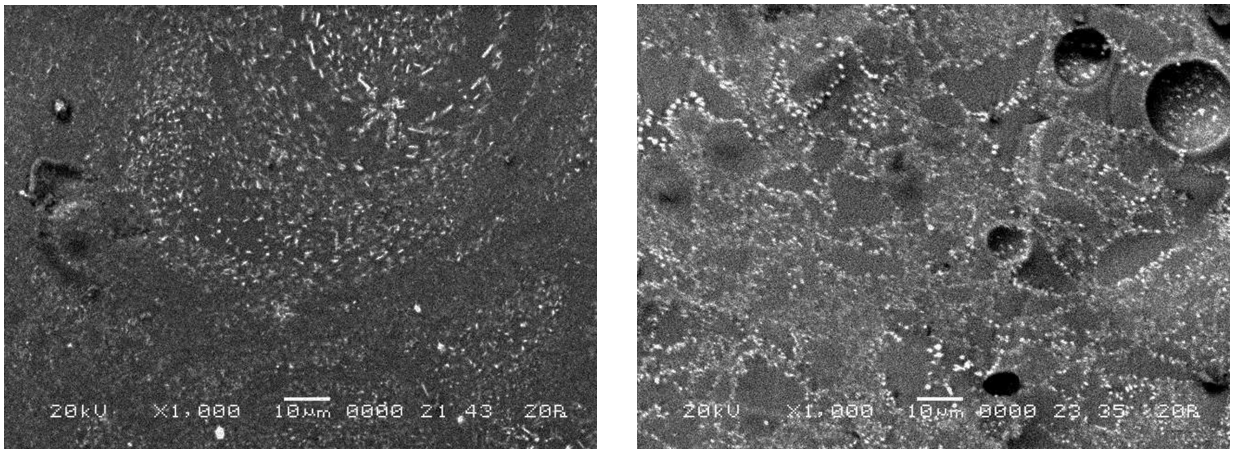
Составы экспериментальных стеклофритт для прозрачных покрытий разрабатывали в системе $Na_2O–K_2O–B_2O_3–Al_2O_3–SiO_2$, для глушеных – в системе $Na_2O–K_2O–CaO–ZnO–B_2O_3–Al_2O_3–ZrO_2–SiO_2$. Варку стеклофритт производили в газовой стекловаренной печи периодического действия при максимальной температуре 1450–1470 °С с выдержкой 1 ч. Затем стеклофритты подвергали помолу в течение 1 ч в лабораторной мельнице «Speedy-1» (Италия) при соотношении материала и мелющих шаров 1:1,2. В суспензию вводили огнеупорную глину марки ДНПК в количестве 13% и калиевую селитру в количестве 0,8%. Полученные глазурные шликеры наносили после утильного обжига на керамическую основу из разработанной массы с улучшенными физико-химическими характеристиками и подвергали обжигу при различных температурах в интервале 900–1100 °С.

Содержание оксидов при синтезе прозрачных глазурей находилось в следующих пределах, %: SiO_2 – 68,09–72,0; Al_2O_3 – 4,0–6,0; B_2O_3 – 12,85–17,80; Na_2O – 6,85–10,25; K_2O – 1,25–2,0. Установлено, что технологические характеристики стеклофритты для прозрачной глазури непосредственно зависят от химического состава, в частности от соотношения $(SiO_2+Al_2O_3)/(Na_2O+Ka_2O)$. Так, в серии исследованных составов соотношение основных оксидов в глазурных покрытиях изменялось от 6,52 до 10,95, что существенно влияло на технологические свойства расплава стекла и качество сформированного покрытия.

На основании анализа полученных результатов оптимальными можно считать значения соотношения $(SiO_2+Al_2O_3)/(Na_2O+K_2O)$, находящиеся в пределах 7,5–8,5, при которых обеспечиваются качественные показатели покрытий с минимальной склонностью к образованию поверхностных дефектов, что может служить критериальным фактором при разработке составов прозрачных глазурей. Градиентная термическая обработка образцов показала, что разработанные прозрачные покрытия формируются в широком температурном интервале, составляющем 980–1100 °С, что позволит производить обжиг в различных тепловых агрегатах. Комплекс физико-химических свойств и декоративно-эстетических характеристик покрытий перспективных составов (блеск – 68–70%, микротвердость – 4900–5100 МПа, ТКЛР – $(4,81–4,97)\cdot10^{-6}$ K^{-1}, термостойкость – 150 °С) позволяет рекомендовать их для декорирования майоликовой посуды. Оптимальным составом, рекомендуемым для масштабных испытаний с целью внедрения в производство, является состав, имеющий значение соотношения $(SiO_2+Al_2O_3)/(Na_2O+K_2O)$, равное 8,5.

Известно, что получение качественных стеклокристаллических покрытий обеспечивается введением в стеклофритты диоксида циркония либо циркона, механизму действия которых посвящены работы ряда отечественных и зарубежных исследователей [6, 7]. При синтезе глушеных глазурных покрытий содержание основных оксидов находилось в пределах, %: SiO_2 55,0–60,0; Al_2O_3 5,0–11,25; ZrO 5,0–11,25; содержание оксидов цинка, бора, кальция, натрия и калия оставалось постоянным и их суммарное количество составляло 30 %.

Для получения информации о процессе формирования стеклокристаллической структуры глушеных покрытий проведена термическая обработка экспериментальных составов при температурах 1010, 1040, 1070 и 1100 °С с выдержкой 1 ч. По основным технологическим характеристикам и показателям физико-механических свойств (степень глушения, укрывистость, белизна, блеск, растекаемость, просвечиваемость, микротвердость, термостойкость) выбран оптимальный состав глушеной глазури, индексированный Н5. Опытно-производственные испытания, проведенные в ОАО «Белхудожкерамика», выявили необходимость улучшения укрывистости и степени заглушенности покрытия, что было достигуто путем вариации содержания оксидов цинка, бора и циркония. Оптимизированному составу присвоен индекс Н5-М1. Фазовый состав покрытия, термообработанного при 1050–1100 °С, представлен цирконом ($ZrSiO_4$) и андалузитом ($\beta–Al_2SiO_5$). В этом температурном интервале, согласно результатам электронно-микроскопического исследования, структура глушеной глазури достигает максимальной однородности и равномерности рас-



а *б*

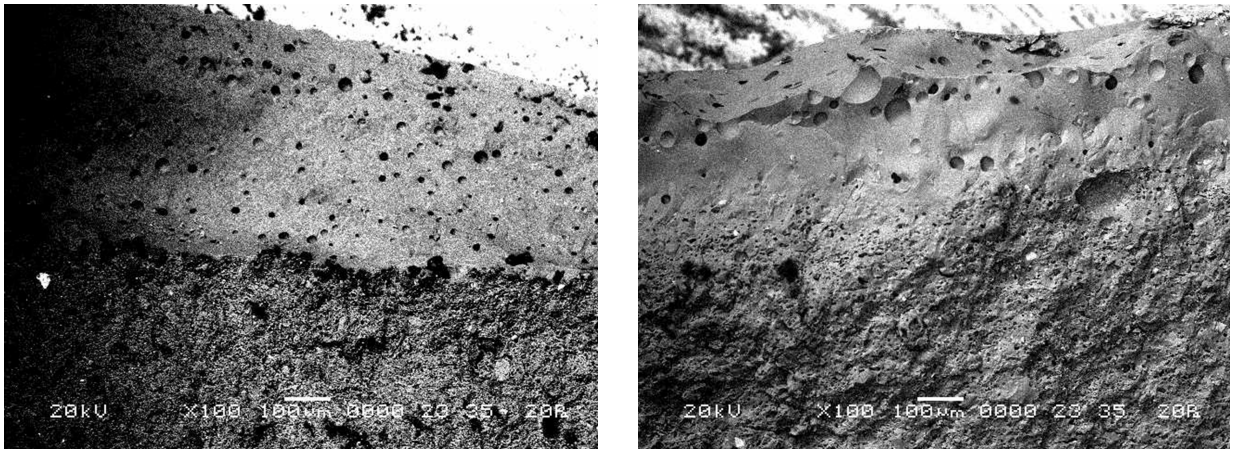
Рис. 3. Электронно-микроскопическое изображение зеркальной поверхности (*а*) и скола (*б*) глушеной глазури оптимального состава H5-M1

Fig. 3. Electron microscope image of the optimal composition opacified glaze H5-M1 mirror surface (*a*) and chip (*б*)

пределения кристаллических образований по всему объему, включая поверхность, что хорошо видно на рис. 3.

Температурный коэффициент линейного расширения глазури составляет $(5{,}02–5{,}05)\cdot10^{-6}$ K^{-1}, термическая стойкость – 150 °С, белизна – 80–82 %, блеск – 87–89 %, микротвердость – 5350–5400 МПа, что свидетельствует о рациональном соотношении кристаллических и стеклообразной фаз в сформировавшемся стеклокристаллическом покрытии H5-M1.

На рис. 4 представлено электронно-микроскопическое изображение поверхности скола в системе керамическая матрица–глазурное покрытие оптимального состава в динамике формирования стеклокристаллического покрытия (1000 → 1100 °С). Отчетливо видна довольно резкая граница между керамическим черепком и глазурным слоем (рис. 4, *а*). Значительное количество пор при 1000 °С свидетельствует о продолжающихся процессах стеклообразования и кристаллизации. Структура покрытия, полученного обжигом при 1100 °С (рис. 4, *б*), соответствует стеклокристаллической с резко уменьшенным количеством пор. Благодаря активным диффузионным процессам и химическому взаимодействию покрытия и керамической основы, контактный слой не дифференцируется и представляет собой метаморфическую зону, что обеспечивает достаточную термическую устойчивость и прочность сцепления [7].



а *б*

Рис. 4. Электронно-микроскопическое изображение скола в гармонизированной системе керамическая матрица – глазурное глушеное покрытие: температура обжига *а* – 1000 °С, *б* – 1100 °С

Fig. 4. Electron microscope image of the chip in ceramic matrix – opacified glaze harmonized system

В табл. 2 приведены основные свойства майоликовых изделий, полученных из разработанного состава керамической массы, декорированных прозрачным (П2) и глушеным (Н5–М1) покрытиями. Проведенные санитарно-гигиенические исследования процессов миграции катионов B^{3+}, $A1^{3+}$ и Zn^{2+} в различные модельные пищевые среды (дистиллированная вода, растворы уксусной, лимонной и молочной кислоты, поваренной соли и этилового спирта) подтвердили их соответствие требованиям СанПиН.

Таблица 2. **Физико-химические свойства майоликовых изделий**

Table 2. **Physical and chemical properties of majolica products**

Свойства изделий	Показатель свойств
Температура политого обжига, °С	960–1090
Водопоглощение, %	8,6–12,5
Термостойкость, °С	150
Механическая прочность при изгибе, МПа	9,5–10,0
Устойчивость к механизированной мойке (согласно ГОСТу Р 55823-2013)	Устойчивы (выдерживают более 250 циклов)
Миграция вредных веществ из глазурных покрытий в пищевые среды (согласно СаНПиН 13–3 РБ 2014)	Отсутствует

Заключение. В результате проведенного комплексного исследования, включающего разработку составов керамической массы и декоративных глазурных покрытий, а также технологических параметров их получения, достигнута генеральная цель – получение майоликовой продукции с улучшенными декоративно-эстетическими характеристиками, повышенными физико-химическими свойствами и эксплуатационной надежностью, что позволит проводить при масштабном использовании посуды на предприятиях общественного питания гигиеническую термическую обработку в посудомоечных машинах различного типа.

Таким образом, современный подход к целенаправленному решению технологических задач, связанных с комбинированием иерархического моделирования и экспериментальных исследований, позволяет быстро, эффективно и логически обоснованно совершенствовать не только технологию получения керамических материалов, но и улучшать их качественные характеристики за счет гармонизации определенных составляющих объектов, повышая эксплуатационную надежность продукции.

Список ипользованных источников

1. Безель, Б. Посудное дело (обзор рынка посудомоечных машин) / Идеи вашего дома. – 2005. – № 3. – С. 85.

2. Дворцин, М. Д. Технодинамика: Основы теории формирования и развития технологических систем / М. Д. Дворцин, В. Н. Юсим. – М.: Междунар. фонд истории науки «Дикси», 1993. – 317 с.

3. Позняк, А. И. Базальтовые и гранитоидные породы как компоненты керамических масс для плиток внутренней облицовки стен / А. И. Позняк, И. А. Левицкий, С. Е. Баранцева // Стекло и керамика. – 2012. – № 8. – С. 17–22.

4. Влияние оксидов железа на вязкость и смачивающую способность силикатных расплавов / О. С. Татаринцева [и др.] // Ползуновский вестник. – 2007. – № 3. – С. 144–149.

5. Уорелл, У. Глины и керамическое сырье / У. Уорелл; пер. с англ. П. П. Смолина; под ред. В. П. Петрова / У. Уорелл. – М.: Мир, 1978. – С. 56–57.

6. Носова, З. А. Циркониевые глазури. З. А. Носова. – М.: Стройиздат, 1972. – 172 с.

7. Левицкий, И. А. Легкоплавкие глазури для облицовочной керамики / И. А. Левицкий. – Минск: БГТУ, 1999. – 396 с.

References

1. Bezel' B., ″Kitchenware business (dishwashers market overview)″, *Idei vashego doma* [Ideas of your home], 2005, no. 3(82), available at: http://www. ivd. ru/stroitelstvo-i-remont/tehnika/posudnoe-delo-4938, (Accessed: 15.11.2016)

2. Dvortsin M. D. and Yusim V. N., *Tekhnodinamika: Osnovy teorii formirovaniya i razvitiya tekhnologicheskikh system* [Technodynamics: Basic theory of the formation and development of technological systems], Mezhdunarodnyi fond istorii nauki «Diksi», Moscow, RU, 1993.

3. Poznyak A. I., Levitskii I. A. and Barantseva S. E., ″Basalt rocks and granitoid masses as components of ceramic tiles for internal wall lining″, *Steklo i keramika* [Glass and ceramics], 2012, no. 8, pp. 17–22.

4. Tatarintseva O. S., Khodakova N. N., Zimin D. E., Uglova T. K. Pavlov V. F., ″Effect of iron oxides on the viscosity and wetting ability of silicate melts″, *Polzunovskii vestnik* [Polzunov's Gazette], 2007, no. 3, pp. 144–149.

5. Uorell U., *Gliny i keramicheskoe syr'e* [Clays and ceramic raw materials], Translated by Smolin P. P., in Petrov V. P. (ed.), Mir, Moscow, RU, 1978.

6. Nosova Z. A., *Tsirkonievye glazuri* [Zirconium glazes], Stroiizdat, Moscow, RU, 1972.

7. Levitskii I. A., *Legkoplavkie glazuri dlya oblitsovochnoi keramiki* [Fusible glazes for ceramic veneering], BGTU, Minsk, BY, 1999.

Информация об авторах

Левицкий Иван Адамович – д-р техн. наук, профессор, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: levitskii@belstu.by.

Баранцева Светлана Евгеньевна – канд. техн. наук, доцент, ст. науч. сотрудник, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svetbar@tut.by.

Позняк Анна Ивановна – канд. техн. наук, науч. сотрудник, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: poznyak_a@inbox.ru.

Information about the authors

Levitskii Ivan Adamovich – D. Sc. (Technical), Professor, Belarusian State Technological University (13a Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: levitskii@belstu.by.

Barantseva Svetlana Evgenievna – Ph. D. (Technical), Associate Professor, Senior Researcher, Belarusian State Technological University (13a Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svetbar@tut.by.

Poznyak Anna Ivanovna – Ph. D., Researcher, Belarusian State Technological University (13a Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: poznyak_a@inbox.ru.

Для цитирования

Левицкий, И. А. Совершенствование качества майоликовой посуды путем создания гармоничной системы керамическая матрица-глазурное покрытие / И. А. Левицкий, С. Е. Баранцева, А. И. Позняк // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 80–87.

For citation

Levitskii I. A., Barantseva S. E., Poznyak A. I. Improving the quality of majolica dishes by creating a ceramic matrix - glazed coating harmonious system. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 80–87. (In Russian).

ISSN 0002-3590(print.)
УДК 661.187.842

Поступила в редакцию 23.09.2016
Received 23.09.2016

В. Е. Амельченко[1], В. С. Болтовский[2], В. Л. Флейшер[2]

[1]Гомельский жировой комбинат, Гомель, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ И МЯТЫ ПЕРЕЧНОЙ

Изучено влияние параметров процесса экстракции ромашки аптечной и мяты перечной 1,2-пропиленгликолем на эффективность извлечения экстрактивных веществ. Получены зависимости, описывающие влияние температуры, продолжительности процесса и соотношения экстрагируемого материала и растворителя на содержание экстрактивных веществ в экстрактах. Установлено, что при уменьшении соотношения сырья и растворителя, повышении температуры и продолжительности процесса содержание экстрактивных веществ увеличивается и максимальное их количество составляет: для мяты перечной – 240 мг/г, для ромашки аптечной – 160 мг/г. Такое содержание экстрактивных веществ в варьируемом диапазоне факторов обеспечивается при следующих условиях: для ромашки аптечной соотношение сырья : 1,2-монопропиленгликоль – 1 : 10, температура – 56 °С, продолжительность экстракции – 50 мин; для мяты перечной 1 : 10, 60 °С, 50 мин соответственно.

Ключевые слова: ромашка аптечная, мята перечная, 1,2-пропиленгликоль, экстрактивные вещества, экстракция, уравнение регрессии, поверхность отклика.

V. E. Amelchenko[1], V. S. Boltovski[2], V. L. Fleisher[2]

[1]Gomel fat-processing integrated works, Gomel, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

THE EFFECT OF EXTRACTION CONDITIONS ON THE EFFICIENCY OF EXTRACTIVES' RECOVERY FROM MATRICARIA CHAMOMILLA AND MENTHA × PIPERITA

The effect of the parameters for extraction process of chamomile and peppermint with 1,2-propylene glycol upon the efficiency of extracting has been studied. Dependencies upon the temperature, the process duration and the extractant – extractive ratio upon the content of extractives in the extracts have been studied. It has been established that with decreasing the ratio of raw materials to solvent, and increasing the temperature and the duration of the process, the content of extractives increases reaching the maximum at 240 mg/g for peppermint and 160 mg/g for chamomile. This content of extractive substances is provided under the following conditions: for chamomile – ratio of raw materials: 1,2-monopropylene glycol – 1: 10, temperature – 56 °C, extraction time – 50 min; For peppermint: 1: 10, 60 °C, 50 min respectively.

Keywoods: chamomile, peppermint, 1,2-propylene glycol, extraction, extractives, regression equation, response surface.

Введение. Несмотря на широкое применение в медицине, фармацевтике, косметике новых веществ, получаемых органическим синтезом, актуальным является использование натуральных компонентов, извлекаемых из растительного сырья.

В настоящее время препараты и биологически активные добавки на основе растительного сырья широко применяются во многих странах. Это обусловлено содержанием в них комплекса различных веществ, которые трудно синтезировать. Экстракты растительного сырья находят широкое применение при изготовлении косметических, профилактических и лечебных средств [1, 2].

Анализ тенденций развития рынка туалетного мыла показал, что одним из наиболее перспективных видов продукции являются высококачественные мыла, обладающие косметическими смягчающими, антиаллергенными, ранозаживляющими, защитными и другими улучшенными потребительскими свойствами [3, 4]. Приоритетное направление получения таких видов мыла – это введение в его основу растительных экстрактов, содержащих натуральные биологически активные вещества. Поэтому разработка эффективных способов их извлечения из растительного сырья с целью последующего применения, в том числе для получения специальных видов туалетного мыла, является актуальной задачей.

© Амельченко В. Е., Болтовский В. С., Флейшер В. Л., 2017

В настоящее время для извлечения биологически активных веществ из растительного сырья применяют различные способы экстракции (экстракция с использованием воды и водяного пара, органических растворителей, а также турбо-экстракция с применением электромагнитных разрядов, высокочастотной и сверхвысокочастотной обработки, ультразвука, сверхкритическая флюидная экстракция и др.) [5, 6]. На практике наиболее широко используются традиционные способы экстракции, основанные на применении различных растворителей – воды, органических растворителей и их водных растворов, масел. Одним из экстрагентов для извлечения комплекса биологически активных веществ, обладающим повышенной устойчивостью к микробиологическому загрязнению, к консервации готовой продукции и являющимся эффективным умягчителем кожи, является 1,2-пропиленгликоль [7, 8], что обусловливает перспективность использования пропиленгликолевых экстрактов для получения косметического туалетного мыла [9].

Цель данной работы – изучить влияние параметров процесса экстракции ромашки аптечной и мяты перечной 1,2-пропиленгликолем на степень извлечения экстрактивных веществ.

Экспериментальная часть. Для большинства видов эфиромасличного сырья характерно невысокое содержание эфирных масел и других биологически активных компонентов. Нами исследован процесс и определены условия получения 1,2-пропиленгликолевых экстрактов ромашки аптечной и мяты перечной. Ромашка аптечная и мята перечная произрастают в различных странах, в том числе в Республике Беларусь, и обладают широким спектром полезных свойств.

Влияние параметров экстракции ромашки аптечной и мяты перечной 1,2-пропиленгликолем на степень извлечения экстрактивных веществ (ЭВ) из сырья исследовали с использованием ортогонального композиционного плана 2-го порядка. Известно [10], что в наибольшей степени на эффективность извлечения экстрактивных веществ органическими растворителями влияют температура процесса, продолжительность экстракции и соотношение сырья и экстрагента. Поэтому в качестве управляемых независимых переменных выбраны температура (X_1), продолжительность (X_2) и соотношение экстрагируемого сырья и растворителя (X_3). Диапазоны варьирования факторов приведены в табл. 1.

Таблица 1. **Уровни факторов и интервалы их варьирования**

Table 1. **Levels of factors and their variation intervals**

Уровень фактора	X_1, °C	X_2, мин	X_3, мас.%
Нулевой уровень	40	30	1 : 15
Интервал варьирования	20	20	1 : 5
–1	20	10	1 : 10
+1	60	50	1 : 20

Для экстракции использовали измельченное сырье размером частиц 1–2 мм. Полученные 1,2-пропиленгликолевые экстракты ромашки аптечной и мяты перечной подвергали переэкстракции диэтиловым эфиром. Диэтиловый эфир затем отгоняли, а остаток экстрактивных веществ высушивали до постоянной массы и определяли их количественное содержание в экстрактах.

Влияние параметров процесса на эффективность извлечения ЭВ оценивали по их содержанию в экстракте ромашки аптечной (Y_1) и мяты перечной (Y_2), мг/г. Матрица планирования и результаты экспериментов приведены в табл. 2.

В результате статистической обработки результатов эксперимента были получены уравнения регрессии, адекватно описывающие зависимость содержания экстрактивных веществ в экстракте ромашки аптечной (Y_1) и мяты перечной (Y_2) от режимных параметров процесса экстракции:

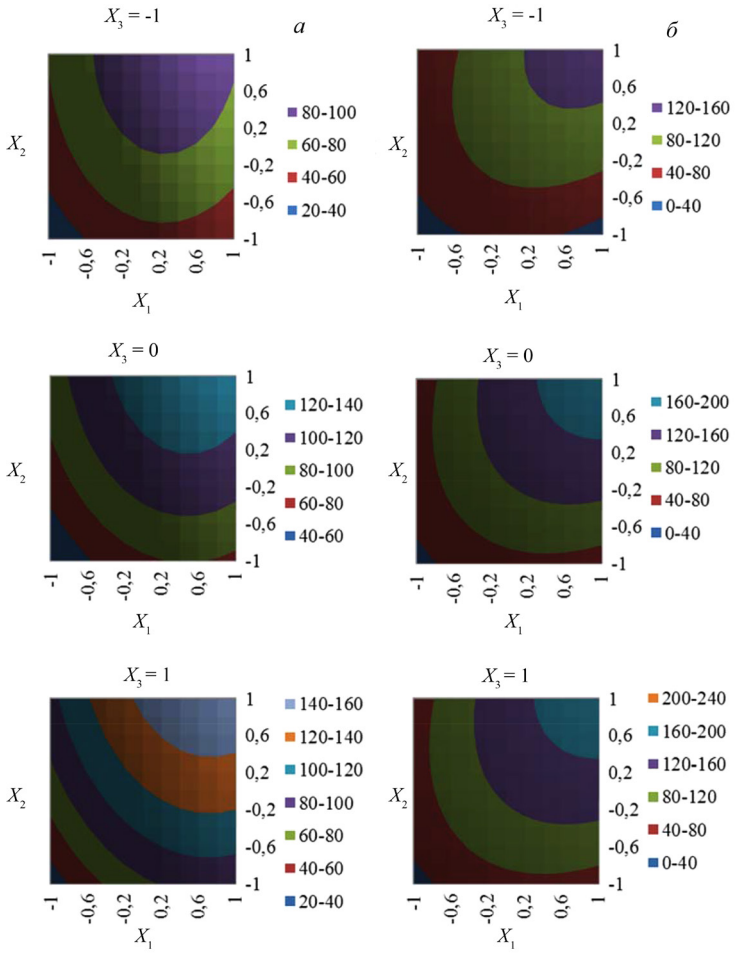
$$Y_1 = 111{,}44 + 19{,}40X_1 + 26{,}30X_2 + 19{,}00X_3 + 0{,}63X_1X_2 + 9{,}37X_1X_3 + \\ + 7{,}38X_2X_3 - 19{,}94X_1^2 - 8{,}44X_2^2 - 11{,}94X_3^2,$$

$$Y_2 = 125{,}94 + 40{,}20X_1 + 37{,}70X_2 + 23{,}40X_3 + 22{,}88X_1X_2 + 16{,}13X_1X_3 + \\ + 4{,}38X_2X_3 - 24{,}44X_1^2 - 19{,}94X_2^2 - 2{,}44X_3^2.$$

Таблица 2. **Матрица планирования и результаты экспериментов**

Table 2. **Planning matrix and results of experiments**

Номер опыта	Факторы процесса						Содержание ЭВ в экстракте (Y), мг/г	
	в кодированном виде			в натуральном виде			ромашки	мяты
	X_1	X_2	X_3	X_1, °С	X_2, мин	X_3, мас.%		
1	+1	–1	+1	60	10	1:20	78	91
2	+1	+1	+1	60	50	1:20	145	211
3	+1	+1	–1	60	50	1:10	76	142
4	+1	–1	–1	60	10	1:10	47	33
5	–1	–1	+1	20	10	1:20	34	21
6	–1	+1	+1	20	50	1:20	90	56
7	–1	+1	–1	20	50	1:10	67	45
8	–1	–1	–1	20	10	1:10	32	34
9	0	0	–1	40	30	1:10	67	69
10	+1	0	0	60	30	1:15	127	142
11	0	–1	0	40	10	1:15	65	55
12	0	+1	0	40	50	1:15	141	157
13	0	0	+1	40	30	1:20	132	178
14	–1	0	0	20	30	1:15	56	61



Контурные графики поверхностей отклика зависимостей влияния температуры (X_1), продолжительности (X_2) и соотношение экстрагируемого сырья и растворителя (X_3) на выход экстрактивных веществ из ромашки аптечной (*а*) и мяты перечной (*б*)

Contour graphics of the dependency response surfaces for temperature (X_1), duration (X_2) and the ratio of extracted raw material and solvent (X_3) upon the yield of extractives from chamomile (*a*) and peppermint (*б*)

Анализ построенных по уравнениям поверхностей отклика и их контурных графиков (рисунок) позволил оценить влияние параметров процесса экстракции ромашки аптечной и мяты перечной 1,2-пропиленгликолем на эффективность извлечения экстрактивных веществ.

Как видно из рисунка, характер зависимостей влияния факторов в заданном диапазоне их варьирования на содержание ЭВ в экстрактах ромашки аптечной и мяты перечной в виде поверхностей отклика уравнений регрессии и их контурных графиков практически идентичен.

На основании их анализа установлено, что при продолжительности процесса экстракции 40–50 мин при соотношении сырья и экстрагента 1 : 10 поверхность отклика проходит через максимум, соответствующий наибольшему выходу ЭВ при температуре 52–56 °С для ромашки аптечной и 58–60 °С для мяты перечной. Дальнейшее увеличение температуры и продолжительности экстракции нецелесообразно вследствие негативного воздействия на термолабильные биологически активные компоненты. Наибольшее содержание экстрактивных веществ в экстрактах ромашки аптечной и мяты перечной достигается при температуре 50–60 °С, продолжительности 45–50 мин и соотношении экстрагируемое сырье : экстрагент 1 : 10.

Заключение. Исследован процесс экстракции ромашки аптечной и мяты перечной 1,2-монопропиленгликолем и получены зависимости, которые описывают влияние основных технологических факторов (температура экстракции, продолжительность процесса и соотношение экстрагируемого материала и растворителя) на эффективность извлечения экстрактивных веществ. Установлено, что при уменьшении соотношения сырья и растворителя, повышении температуры и продолжительности процесса количество экстрактивных веществ увеличивается и максимально составляет: для мяты перечной – 240 мг/г, для ромашки аптечной – 160 мг/г. Такое содержание экстрактивных веществ в варьируемом диапазоне факторов обеспечивается при следующих условиях: для ромашки аптечной – соотношение сырья : 1,2-монопропиленгликоль – 1 : 10, температура – 56 °С, продолжительность экстракции – 50 мин; для мяты перечной – 1 : 10, 60 °С, 50 мин соответственно.

Список использованных источников

1. Баньковский, А. И. Химическое изучение некоторых лекарственных растений и разработка методов получения препаратов из них / А. И. Баньковский. – М.: Медицина, 1970. – 385 с.

2. Коган, В. И. Вопросы комплексного использования лекарственного растительного сырья / В. И. Коган, О. Н. Толкачев, Л. Д. Вечканова // Химическая и медико-биологическая оценка новых фитопрепаратов: сб. науч. трудов ВИЛР. – М., 1989. – С. 12–20.

3. Черепанов, А. Н. Современные тенденции в развитии моющих средств / А. Н. Черепанов // Масложировая пром-сть. 2002. – № 4. – С. 41.

4. Фроловская, Т. Н. Повышение эффективности производства моющих средств и улучшение качества продукции / Т. Н. Фроловская, Т. В. Дронникова // Масложировая пром-сть. 2003. – № 3. – С. 27–28.

5. Традиционные и современные способы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки / А. С. Коничев [и др.] // Вестн. МГУ. – 2011. – № 3. – С. 49–54.

6. Букеева, А. В. Обзор современных методов выделения биологически активных веществ из растений / А. В. Букеева, С. Ж. Кудайбергенова // Вестн. ЕНУ им. Л. Н. Гумилева. – 2012. – № 2. – С. 192–197.

7. Войцеховская, А. Л. Косметика сегодня / А. Л. Войцеховская, И. И. Вольфензол. – М.: Химия, 1991. – 150 с.

8. Способ получения водосодержащих пропиленгликолевых экстрактов растительного сырья с повышенной устойчивостью к микробиологическому загрязнению: пат. 2 372 132 Рос. Федерация. № 2008134411/15; заявл. 21.08.08; опубл. 10.11.09.

9. Амельченко, В. Е. Получение косметического туалетного мыла, обладающего улучшенными потребительскими свойствами / В. Е. Амельченко, В. Л. Флейшер, В. С. Болтовский // Труды БГТУ. Сер. Химия, технология орган. веществ и биотехнология. – 2014. – № 5. – С. 74–76.

10. Сидоров, И. И. Технология натуральных эфирных масел и синтетических душистых веществ / И. И. Сидоров, Н. А. Турышева, Л. П. Фалеева. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. – 386 с.

References

1. Ban'kovskii A. I., *Khimicheskoe izuchenie nekotorykh lekarstvennykh rastenii i razrabotka metodov polucheniia preparatov iz nikh* [Chemical study of some medicinal plants and the development of methods for drug preparation from them], Medicina, Moscow, RU, 1970.

2. Kogan V. I., Tolkachev O. N., Vechanova L. D., "On integrated use of medicinal plants", *Khimicheskaia i mediko-biologicheskaia otsenka novykh fitopreparatov : Sb. nauch. tr.* [Coll. scientific. Proceedings VILR «Chemical and medical-biological evaluation of new herbal medicines»], NPO "VILR", Moscow, RU, 1989, pp. 12–20.

3. Cherepanov A. N., "Modern trends in the development of detergents", *Maslozhirovaia promyshlennost'* [Oilseed industry], 2002, no 4, p. 41.

4. Frolovskaia T. N., Dronnikova T. V., "Improving the efficiency of detergent production and product quality", *Maslozhirovaia promyshlennost'* [Oilseed industry], 2003, no 3, pp. 27–28.

5. Konichev A. S., Baurin P. V., Fedorovskii N. N., Marakhova A. I., Iakubovich L. M., Chernikova M. A., "Traditional and modern methods of biologically active substance extraction from plant raw materials: prospects, advantages, disadvantages", *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo universiteta* [Bulletin of Moscow State University], 2011, no. 3, pp. 49–54.

6. Bukeeva A. V., Kudaibergenova S. Zh., "An overview of modern methods for isolation of biologically active substances from plants", *Vestnik ENU im. L. N. Gumileva* [Bulletin of ENU named after LN Gumilyov], 2012, no. 2, pp. 192–197.

7. Voitsekhovskaia A. L., Vol'fenzol I. I., *Kosmetika segodnia* [Cosmetics today], Khimiia, Moscow, RU, 1991.

8. Voloshina A. D., Kurbanova I. I., Magdeev I. M., Punegova L. N., Siniashin O. G., Smolentsev A. V., Khasianzianova F. S., Shitova T. S., Uchrezhdenie Rossiiskoi akademii nauk Institut organicheskoi i fizicheskoi khimii im. A. E. Arbuzova Kazanskogo nauchnogo tsentra RAN, *Sposob polucheniia vodosoderzhashchikh propilenglikolevykh ekstraktov rastitel'nogo syr'ia s povyshennoi ustoichivost'iu k mikrobiologicheskomu zagriazneniiu* [The process for producing water-containing propylene glycol extracts of vegetable raw materials with improved resistance to microbiological contamination], Federal'naia Sluzhba po intellektual'noi sobstvennosti, patentam i tovarnym znakam, Kazan, RU, Pat. 2372135, 2008.

9. Amel'chenko V. E., Fleisher V. L., Boltovskii V. S., "Production of cosmetic soap with improved consumer properties", *Trudy BGTU. Ser. Khimiia, tekhnologiia organicheskikh veshchestv i biotekhnologiia* [Proceedings of BSTU. Chemistry, Technology of Organic Substances and Biotechnology], 2014, no. 5, pp. 74–76.

10. Sidorov. I. I., Turysheva N. A., Faleeva l. P., *Tekhnologiia natural'nykh efirnykh masel i sinteticheskikh dushistykh veshchestv* [The technology of natural essential oils and synthetic fragrances], Light and food industry, Moscow, RU, 1984.

Информация об авторах

Амельченко Виталий Евгеньевич – начальник мыловаренного цеха, Гомельский жировой комбинат (ул. Ильича, 4, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: amelvitali@yandex.ru.

Болтовский Валерий Станиславович – д-р техн. наук, профессор, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v-boltovsky@rambler.ru.

Флейшер Вячеслав Леонидович – канд. техн. наук, доцент, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v_fleisher@list.ru.

Для цитирования

Амельченко, В. Е. Влияние условий экстракции на эффективность извлечения экстрактивных веществ из ромашки аптечной и мяты перечной / В. Е. Амельченко, В. С. Болтовский, В. Л. Флешер // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 88–92.

Information about authors

Amelchenko Vitali Evgenevich – Head of Soap Shop, Publicly Traded Company «Gomel fat-processing integrated works» (4 Il'icha Str., Gomel, Republic of Belarus). E-mail: amelvitali@yandex.ru.

Boltovski Valery Stanislavovich – D. Sc. (Engineering), Professor, Belarusian State Technological University (13a Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v-boltovsky@rambler.ru.

Fleisher Vyacheslav Leonidovich – Ph. D. (Engineering), Associate Professor, Belarusian State Technological University (13a Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v_fleisher@list.ru.

For citation

Amelchenko V. E., Boltovski V. S., Fleisher V. L**.** The effect of extraction conditions on the efficiency of extractives' recovery from *Matricaria chamomilla* and *Mentha* × *piperita*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 88–92. (In Russian).

ISSN 0002-3590(print.)

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.322.23

Поступила в редакцию 10.01.2017
Received 10.01.2017

Д. О. Дормешкин[1], Е. А. Бричко[2], А. А. Гилеп[1], С. А Усанов[1]

[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ В КОНСТРУИРОВАНИИ АНТИТЕЛ С ЗАДАННЫМИ СВОЙСТВАМИ

Уникальная особенность моноклональных антител высокоспецифично взаимодействовать с молекулярными мишенями позволила им занять ведущее положение в терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний, стать незаменимым инструментом протеомных исследований и компонентом диагностических систем. Представлен обзор новейших литературных данных по использованию метода фагового дисплея для получения рекомбинантных антител, которые другими методами получить невозможно, а также собственные оригинальные результаты в этой области. На основании бионформационного анализа структур депонированных комплексов антител с антигенами нами создана комбинаторная библиотеки *Fab* фрагментов антител человека, обладающая разнообразием более 10^{10} независимых клонов и способная служить источником рекомбинантных антител. С использованием негативной селекции нами получены и характеризованы высокоспецифичные однодоменные антитела к альдостерон-синтазе (цитохром Р45011В2, CYP11B2), не обладающие в ИФА кросс-реактивностью с ее гомологом CYP11B1 (93% идентичности последовательностей), а также антитела к таким высокомолекулярным мишеням, как эритропоэтин, соматотропный гормон и тиреопероксидаза человека.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, фаговый дисплей, молекулярное клонирование, цитохромы Р450.

D. O. Dormeshkin[1], E. A. Brichko[2], A. A. Gilep[1], S. A Usanov[1]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

PHAGE DISPLAY IN ENGINEERING OF ANTIBODIES WITH DESIRED PROPERTIES

Antibodies are an essential tool being a part of immunodiagnostics, therapeutics and life science research instruments. In this paper we analyze the recent developments in recombinant antibodies generation by means of phage display technology. We also provide our own results dedicated to antibodies development process. Analysis of antibody-antigen complexes with resolved structures allow to create synthetic phage display library of *Fab* antibody fragments with the diversity of 10^{10} independent clones. Utilizing a negative selection approach, we succeeded in generation and characterization of specific single-domain antibodies that has substantially different binding kinetics to CYP11B2 and CYP11B1 isoenzymes – proteins with 93% sequence identity. We also generated specific binders to a few high-molecular weight human antigens – erytropoetin, growth hormone and thyroperoxidase.

Keywords: recombinant antibodies, phage display, molecular cloning, cytochromes P450.

Введение. Начиная с середины 1990-х годов фармацевтический рынок претерпевает глобальные изменения, связанные со смещением интереса производителей от синтеза низкомолекулярных субстанций к биотехнологическому производству биофармацевтических препаратов. По прогнозам аналитиков уже к 2050 г. более 75% фармацевтического рынка будет представлено биофармпрепаратами. В частности, особый интерес представляют препараты на основе моноклональных антител.

Ключевая особенность антител специфично взаимодействовать с разнообразными молекулярными мишенями позволила им занять ведущее положение в терапии различных заболеваний, в особенности онкологических и аутоиммунных, а также стать незаменимым инструментом протеомных исследований и компонентом диагностических систем [1–3]. Большинство диагно-

стических систем, применяемых в клинической диагностике, основаны на принципе аффинного узнавания антигена соответствующими антителами. На сегодняшний день уже более 65 препаратов терапевтических антител одобрено FDA к применению, еще сотни проходят клинические испытания (таблица) [3]. Ожидается, что в 2017 г. общий объем продаж этих препаратов составит более 90 млрд дол. США [4]. В рамках проекта *Human Proteome Atlas* получены и валидированы антитела практически ко всем белкам протеома человека [5, 6]

Такие успехи были бы невозможны без развития молекулярно-генетических методов, позволяющих получать рекомбинантные антитела и их фрагменты с заданными свойствами. Наиболее эффективной из таких технологий является фаговый дисплей, который позволяет получать в кратчайшие сроки (от двух недель) антитела с заданными свойствами практически к любым низко- и высокомолекулярным мишеням, включая токсичные и неиммуногенные антигены.

Основные, одобренные к применению FDA, препараты терапевтических антител

Some FDA approved thevapeutic antibodies

Область использования	Год	Производитель	Действующее вещество (торговое название)	Мишень	Формат антитела
Трансплантология	1986	Ortho Biotech (J&J)	Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®)	CD3	IgG2a мыши
	1997	PDL/Roche	Daclizumab (Zenapax®)	CD25	IgG1 гуманизированное
	1998	Novartis	Basiliximab (Simulect®)	CD25	IgG1 гуманизированное
Онкология	1997	Biogen/ Genentech	Rituximab (Rituxan®)	CD20	IgG1 гуманизированное
	1998	Genentech	Trastuzumab (Herceptin®)	HER2	IgG1 гуманизированное
	2003	Corixa	^{131}I-tositumomab (Bexxar®)	CD20	Конъюгат IgG1 мыши с изотопом йода-131
	2014	Merck	Pembrolizumab (Keytruda®)	PD-1	IgG1 гуманизированное
	2016	Genentech/Roche	Atezolizumab (Tecentriq®)	PD-L1	IgG1 гуманизированное
Диагностика	1996	Cytogen	^{111}In-capromab pendetide (Prostascint®)	PSMA	Конъюгат с изотопом индия-111
	1999	Immunomedics	^{99m}Tc –arcitumomab (CEA-Scan®)	CEA	Конъюгат с изотопом технеция-99
Аутоиммуные заболевания	2003	CAT, Abbott	Adalimumab (Humira®)	TNFα	IgG1 человека
	2008	UCB/ Schwartz	Certolizumab pegol (Cimzia®)	TNFα	Пегилированные гуманизированные Fab
	2004	Genentech	Omalizumab (Xolair®)	IgE	IgG1 гуманизированное
	2003	Genentech/Merck	Efalizumab (Raptiva®)	LFA-1	IgG1 гуманизированное
	2016	TEVA Respiratory	Reslizumab (Cinqair®)	IL-5	IgG1 гуманизированное
Сердечно-сосудистые заболевания	1994	Centocor/Lilly	Abciximab (ReoPro®)	Комлекс гликопротеинов IIB-IIIA	Fab химерный IgG1
Инфекционные заболевания	2016	Merck	Bezlotoxumab (Zinplava®)	токсин *TcdB Clostridium difficile*	IgG1 человека
Офтальмология	2015	Genentech/ Novartis	Lucentis® (Ranibizumab)	VEGF-A	Fab-гуманизированные

Форматы рекомбинантных антител. Развитие рекомбинантных технологий позволяет создавать огромное разнообразие антител и их фрагментов даже тех, которые не встречаются в природе. Модульная структура иммуноглобулинов позволяет в зависимости от поставленных задач и целей исследования реализовывать набор функций, связанных с конкретным доменом, изолируя его или комбинируя с другими модулями (рис. 1).

Молекула иммуноглобулина условно может быть разделена на две функциональные субъединицы – *Fab* (fragment antigen binding – антигенсвязывающий фрагмент) и *Fc* (fragment crystallizable region – кристаллизующегося фрагмента антитела) фрагменты. *Fc* фрагмент состоит из двух пар

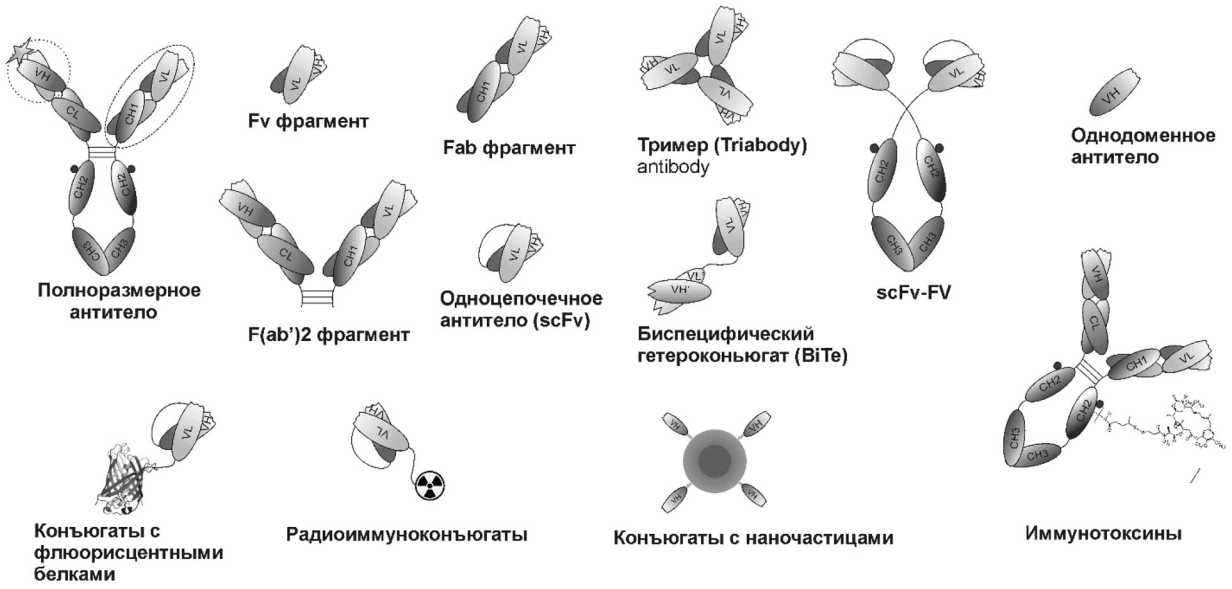


Рис. 1. Рекомбинантные антитела, их фрагменты и конъюгаты

Fig. 1. Recombinant antibody fragments and conjugates

константных доменов (CH2 и CH3) и отвечает за взаимодействие с клеточными рецепторами при активации иммунного ответа, а также с белками системы комплемента. *Fab* фрагмент участвует в распознавании антигена и состоит из одного вариабельного участка (VL и VH) и одного константного (CL и CH1). Между собой отдельные полипептидные цепи связаны дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями [7]. Кроме того, на уровне CH2 участка молекула гликозилирована.

Первыми укороченными антителами стали *Fab* фрагменты антител, полученные удалением *Fc* фрагмента иммуноглобулинов класса G с помощью протеолитических ферментов [8]. Полученные фрагменты сохраняют структурную стабильность в растворе и антигенсвязывающие свойства исходных антител. Кроме того, почти втрое меньший по сравнению с полноформатным антителом размер мономерного *Fab* фрагмента обеспечивает лучшее проникновение в клетки при терапевтическом применении. Примером применения подобных вариантов антител является Lucentis® (Ranibizumab) – препарат для лечения возрастной дегенерации сетчатки глаза, который получают в виде рекомбинантных *Fab* фрагментов в бактериальной системе *E. coli* [9].

По настоящему широкое распространение модифицированные форматы антител получили с развитием методов генетической инженерии. Одноцепочечные вариабельные фрагменты антител, *scFv* (single chain variable fragments – одноцепочечные вариабельные фрагменты) представляют собой VH и VL домены, ковалентно связанные гибким пептидным линкером, в роли которого наиболее часто выступает аминокислотная последовательность $(GGGGS)_3$ [10]. Вследствие малого размера (28 кДа) и отсутствия *Fc* домена, *scFv* антитела обладают относительно высокой проникающей способностью и малым временем полувыведения из организма, что в случае их терапевтического использования в виде радиоиммуноконьюгатов или иммунотоксинов является определенным преимуществом [11]. Самостоятельно *scFv* фрагменты не способны активировать систему комплемента, а также вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность. При этом отказ от использования двух фундаментальных систем защиты организма от инородных клеток и злокачественных образований в большинстве случаев является нежелательным эффектом с точки зрения терапевтического применения, поэтому чаще всего узнающий модуль перспективных кандидатов получают в формате полноразмерных антител либо в виде сшитых белковых комплексов.

Методы генетической инженерии позволяют получать сшитые белковые комплексы антител как для исследовательских нужд – визуализация, повышение уровня экспрессии, так и для

терапии и диагностики – расширение эффекторных функций и системы детекции. Например, цитокин – интерлейкин-2 – активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), положительно сказываясь на терапевтическом эффекте моноклональных антител [12]. Совместное применение этих препаратов осложняется побочными эффектами высоких доз интерлейкина-2 и необходимостью его использования в высоких концентрациях [13]. Антитела с такими иммуностимуляторными цитокинами, как интерлейкин-2, интерлейкин-12, ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), могут быть получены в виде сшитых белковых комплексов, что повышает их локальную концентрацию в микроокружении опухолевых клеток, снижая системные побочные эффекты [14, 15].

Визуализация антител с помощью сшитых белковых комплексов находит применение как в прикладных задачах (иммуногистохимия), так и в научных исследованиях для создания новых антигенузнающих модулей и оптимизации процесса их получения [16].

С целью оптимизации и визуализации процесса экспрессии рекомбинантных антител нами сконструирован новый сшитый белковый комплекс *Fab* и *scFv* фрагментов антител с гемопротеидом – цитохромом b_5, который, благодаря характеристическому спектру поглощения, позволяет детектировать процесс выделения и очистки антител, измерять их концентрацию спектрофотометрически в сложных смесях, а также оценивать значение окислительно-восстановительного потенциала их окружения (рис. 2) [17].

Комплекс *Fab* и *scFv* сохраняет антигенсвязывающую активность антитела, спектральные характеристики гемопротеина, а также характеризуется троекратным увеличением выхода рекомбинантного белка по сравнению с не сшитыми с цитохромом b_5 рекомбинантными антителами [17].

Наименьшим фрагментом, способным связывать антигены на сегодняшний день, являются однодоменные антитела, в которых узнающий модуль представляет собой одиночный домен тяжелой цепи VH, который, несмотря на отсутствие легкой цепи, сохраняет способность аффинно и специфично связывать низко- и высокомолекулярные антигены. Впервые однодоменные антитела были получены из иммуноглобулинов класса млекопитающих рода *Camelidae*, в сыворотке крови которых были обнаружены иммуноглобулиноподобные молекулы с отсутствующей легкой цепью [18]. Кроме этого, однодоменные антитела V_{NAR} (Variable New Antigen Receptor – новый вариабельный антигенный рецептор) найдены у многих хрящевых рыб, таких как акулы. Они существенно отличаются по свойствам и структуре как от вариабельных доменов антител человека, так и от однодоменных антител ламы, в первую очередь более длинными антигенсвязывающими петлями, стабилизированными большим количеством дисульфидных связей [19].

На сегодняшний день существуют технологии получения однодоменных антител человека с применением технологии фагового дисплея, когда протяженные гидрофобные участки VH домена,

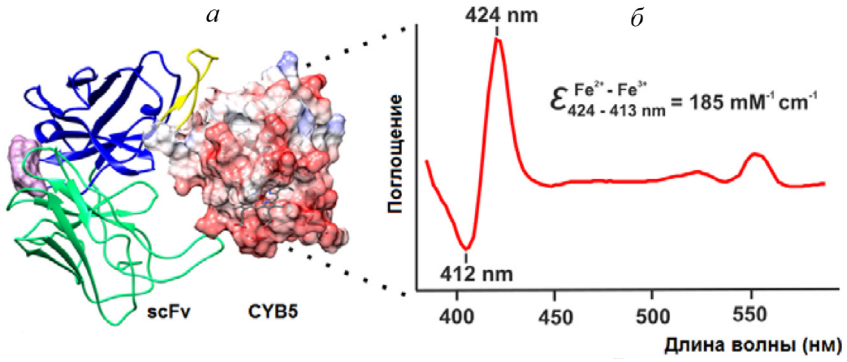


Рис. 2. Молекулярная модель *scFv-b5* сшитого белка (*а*); разностный спектр поглощения – окисленный/восстановленный *scFv-b5* (*б*)

Fig. 2. Model of the fusion protein built using *in silico* analyses (*a*); difference absorption spectrum (oxidized/reduced) of purified *scFv-b5* (*б*)

участвующие в природных антителах в связывании VL домена, заменяются на гидрофильные участки, гомологичные соответствующим областям VH домена антител ламы [20]. Более простая структура по сравнению с *scFv* фрагментами обеспечивает большую стабильность однодоменных антител, что, несомненно, является значительным преимуществом практически во всех областях их использования, а меньший размер (15 кДа) позволяет расширить область их терапевтического применения за счет большей проникающей способности данного антитела в клетку. В связи с этим сразу несколько терапевтических препаратов на основе однодоменных антител в настоящее время проходят доклинические и клинические испытания [21–24]. В исследованиях и диагностике большие надежды возлагаются на коньюгаты однодоменных антител с наночастицами, например с квантовыми точками для *in vivo* визуализации и терапии опухолевых заболеваний – тераностики [25, 26].

Известно значительное количество альтернативных антигенсвязывающих молекул неиммуноглобулиновой природы, которые охватывают различные белковые семейства и варианты укладок цепей – фибронектиновый домен, липокалин, белок А, анкириновые повторы, PDZ-домены [27–29]. Отбор аффинных вариантов осуществляется дисплейными методами, например используя комбинаторные фаговые библиотеки. Потенциально альтернативные каркасные белки могут расширить терапевтическую применимость антител и их фрагментов за счет малого размера и высокой стабильности в редокс-активном внутриклеточном окружении в случае связывания внутриклеточных мишеней. В данный момент проходят клинические испытания реагенты для *in vivo* диагностики и визуализации опухолевых заболеваний [30].

Технологии получения. Главным фактором, сдерживающим широкое использование антител в терапии и диагностике, долгое время являлась невозможность получения продуцирующих индивидуальные антитела клеточных линий, способных расти в культуре продолжительное время. Это затруднение было решено Жоржем Кёлером и Сезаром Мильштейном в 1975 г. в предложенной ими гибридомной технологии, отмеченной Нобелевской премией по физиологии в 1984 г. [31].

Основная идея гибридомной технологии заключается в слиянии В-лимфоцитов, продуцирующих антитела, с миеломными клетками, обладающими способностью к неограниченному делению с последующим отбором на селективной среде гибридных клеток – гибридом. Полученные гибридомы наследуют способность синтезировать моноклональные антитела от В-лимфоцитов и неограниченно делиться от миеломных клеток. Гибридомная технология совершила прорыв в иммунологической индустрии, благодаря ей возникли совершенно новые средства диагностики, новые способы изучения многих заболеваний, а также средства для их терапии.

Технология рекомбинантных ДНК расширила возможности гибридомной технологии, сделав возможным клонирование генов, кодирующих легкую и тяжелую цепи антител, продуцируемых гибридомами [32, 33]. Это позволяет получать фрагменты антител в бактериальной системе *E. coli* и изменять такие свойства антител, как аффинность и авидность, число и специфичность паратопов, состав доменов, подвижность молекулы, молекулярную массу, изоэлектрическую точку и потенциальную иммуногенность [34, 35].

Высокая степень гетерогенности нуклеотидных последовательностей, кодирующих иммуноглобулины, обуславливаемая их биологической функцией и механизмом генерации, зачастую осложняет задачу их клонирования, когда исследователю неизвестна точная последовательность фланкирующей области гена интереса [11]. Существует ряд подходов к клонированию генов, кодирующих иммуноглобулины, однако в ряде случаев вследствие соматических мутаций в FRI регионе вариабельных генов их амплификация со стандартными олигонуклеотидными праймерами становится невозможной [36].

Нами проведено множественное выравнивание всех имеющихся в базе данных IMGT (International ImMunoGeneTics information system – www.imgt.org) нуклеотидных последовательностей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов мыши и на основании анализа этих данных сконструированы олигонуклеотидные праймеры для амплификации высоковариабельных генов иммуноглобулинов мыши, комплементарных не менее чем на 94% известным нуклеотидным последовательностям. Это позволило с высокой эффективностью провести клонирование антител

к кортизолу и тиреопероксидазе человека – ТПО (КФ 1.11.1.8) и получить *in vivo* биотинилированные *Fab* и *scFv* фрагменты этих антител [37]. Рекомбинантные *Fab* и *scFv* фрагменты антител к кортизолу не отличаются по аффинности и специфичности от полноразмерных родительских, в то время как *Fab* и *scFv* к ТПО обладают, к сожалению, чрезвычайно низкой стабильностью, что ограничивает их использование в иммунохимических системах без дополнительных модификаций. Это свидетельствует о том, что не всегда возможно манипулировать модульной структурой полноразмерных антител без ущерба для их физико-химических свойств.

На сегодняшний день созданы гибридомные линии, продуцирующие антитела к широкому кругу мишеней. Технология разработана и описана достаточно полно и получение аффинных антител практически к любым высоко- и низкомолекулярным мишеням стало рутинной процедурой [38]. Несмотря на это, иммунизация лабораторных животных требует значительных временных затрат и зачастую не позволяет получать антитела к неиммуногенным или токсичным мишеням. Серьезным ограничением терапевтического применения моноклональных антител, полученных по этой технологии, является их иммуногенность для человека. Ввиду детерминированности условий отбора В-лимфоцитов в ходе иммунизации отсутствует возможность осуществлять селективное давление на этот процесс – получение антител с заданной кросс-специфичностью, антител к определенным конформационным эпитопам белков, к нативным белковым комплексам становится трудновыполнимой задачей.

Ведущей технологией получения рекомбинантных антител на сегодняшний день являются дисплейные методы, в частности метод фагового дисплея [39]. В процессе селекции антител методами фагового дисплея отбор аффинных вариантов проходит *in vitro*, что позволяет контролировать такие параметры процесса, как значения pH, ионной силы, наличие детергентов и хаотропных агентов, время и температуру инкубации, осуществлять негативную селекцию [40]. Это позволяет значительно ускорять процесс генерации антигенсвязывающего клона и получать антитела заданной эпитопной специфичности и кросс-реактивности практически к любым мишеням без участия лабораторных животных [41].

Фаговый дисплей как универсальный инструмент поиска аффинных молекул с заданными характеристиками. Наиболее полно разработанным дисплейным методом является метод фагового дисплея, совмещающий в себе *in vitro* и *in vivo* стадии отбора наиболее аффинных вариантов антител. Основой методологии фагового дисплея послужили эксперименты Г. Смита в 1985 г., в ходе которых короткие фрагменты эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* были экспрессированы на поверхности капсида нитчатого бактериофага M13 вместе с другими белками оболочки вирусной частицы [39]. Это стало возможным вследствие встраивания гена, кодирующего этот фрагмент, в геном бактериофага в единую рамку считывания с белком g3p оболочки фага M13.

Таким образом была достигнута связь между «фенотипом» – экспонированным на поверхности фаговой частицы полипептидом и «генотипом» – геном, кодирующим его структуру. Эта связь является фундаментальной основой метода фагового дисплея – отбор генетических вариантов полипептидов по свойствам транслируемых белков [42].

Вместо того чтобы экспрессировать и анализировать различные генетически сконструированные варианты рекомбинантных антител, появляется возможность одновременно анализировать пул фагов, содержащий до 10^{11} независимых фаговых частиц с различными вариантами антител на поверхности, которые могут быть сконструированы одновременно. Такие библиотеки позволяют легко отбирать фаговые частицы, на поверхности которых экспрессируется белок с наибольшей аффинностью и специфичностью по отношению к интересующему антигену. После каждого раунда селекции к антигену библиотека обогащается специфическими антителами.

После селекции наиболее аффинные и специфичные антитела могут быть легко сконвертированы в полноформатные антитела для наделения их эффекторными функциями или использованы для создания химерных конструкций для научно-исследовательских, диагностических или терапевтических применений [43].

Для отбора из комбинаторных библиотек специфических антител проводят процедуру биопэнинга – аффинного обогащения библиотеки антителами, направленными к целевому

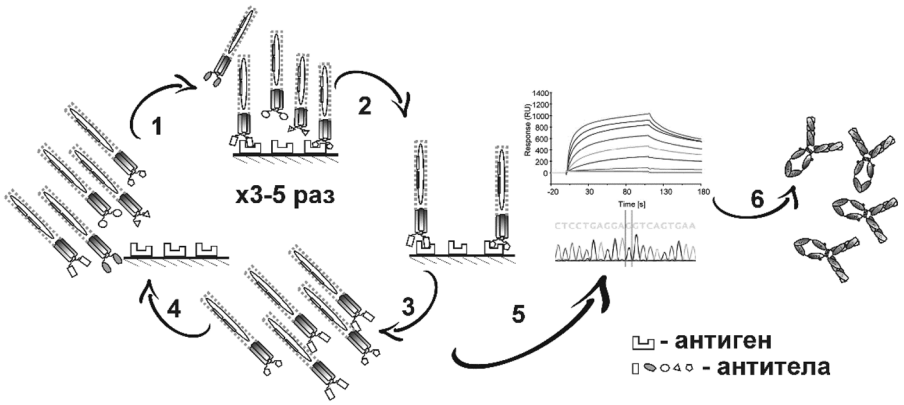


Рис. 3. Схема биопэнинга: *1* – инкубация библиотеки с иммобилизованной мишенью, *2* – отмывка низкоаффинных вариантов, *3* – амплификация высокоаффинных вариантов, *4* – инкубация вторичной амплифицированной библиотеки, *5* – анализ клонов, *6* – наработка антител

Fig. 3. Biopanning scheme (*1* – phage display library incubation with immobilized antigen, *2* – poor binders washing, *3* – strong binders amplification, *4* – enriched secondary library incubation, *5* – antibodies analysis, *6* – antibodies expression and purification)

антигену. Для этого в одном из вариантов данной процедуры иммобилизованный антиген инкубируют с фаговой библиотекой, затем не связавшиеся антитела удаляют, а связавшиеся элюируют и используют для инфицирования клеток. Наработанные в *E. coli* бактериофаги выделяют и используют для следующего раунда биопэнинга (рис. 3). Обогащенную библиотеку используют для отбора индивидуальных антител, направленных к целевому антигену [44].

Первым препаратом терапевтического антитела, полученным с помощью данной технологии, является Adalimumab (Humira®) – бестселлер фармацевтического рынка с ежегодным объемом продаж более 13 млрд дол. США, что стало наглядным подтверждением возможностей этой технологии.

В зависимости от подхода, который лежит в основе создания разнообразия нуклеотидных последовательностей, и, как следствие, свойств экспонируемых антител все фаговые библиотеки можно разделить на натуральные, где разнообразные вариабельные фрагменты получены из сыворотки крови иммунизированных или неиммунизированных доноров и синтетические (комбинаторные), в которых разнообразие в вариабельные фрагменты антител вводится в ходе *in vitro* процедур чаще всего методами ПЦР и сайт-направленного мутагенеза [45]. К натуральным библиотекам относятся так называемые «*иммунные*» (immune) и «*наивные*» (naïve) библиотеки.

Иммунные библиотеки создаются на основе мРНК периферических лимфоцитов доноров, иммунизированных каким-либо антигеном [46]. Вследствие уже прошедшего аффинного созревания они обогащены антителами к антигену, которым была произведена иммунизация, что облегчает выделение высокоаффинных вариантов. Разнообразие подобных библиотек составляет 10^5–10^7 клонов и этого в большинстве случаев достаточно для получения целевых антител [45]. К тому же незначительный размер библиотеки технически упрощает работу с ней. Основным недостатком использования иммунных библиотек является необходимость проведения процедуры иммунизации и создания библиотеки каждый раз для различных антигенов. Кроме этого, с использованием иммунных библиотек невозможно получать антитела к токсичным и иммуносупрессорным антигенам, а также антигенам к аутоантигенам. В случае терапевтического интереса к получаемым антителам требуется трудоемкая процедура гуманизации изолированных антител. Исключением является выделение антител с использованием доноров, имеющих аутоиммунные, онкологические и вирусные заболевания [47, 48].

«Наивные» библиотеки конструируются на основе мРНК периферических В-лимфоцитов группы неиммунизированных доноров, вследствие чего одна библиотека может служить источником антител к большому количеству антигенов [49]. Отпадает необходимость в процедуре иммунизации и становится возможным получение антител к токсичным и неиммуногенным мишеням.

Основным недостатком по сравнению с иммунными библиотеками является невысокая (чаще всего микромолярная) аффинность изолированных антител, что требует дополнительных процедур *in vitro* аффинного созревания – создания вторичных библиотек и сайт-направленного мутагенеза; зачастую возможны проблемы с экспрессией и стабильностью отобранных вариантов.

Накопление данных о структуре иммуноглобулинов и их антигенсвязывающих участков позволили выяснить вклад отдельных пространственных структур и аминокислот в аффинное взаимодействие. Эти знания позволяют конструировать *синтетические* (комбинаторные) библиотеки с заданными физико-химическими свойствами и искусственно введенным аминокислотным разнообразием [50]. Библиотеки такого вида имеют ряд существенных преимуществ. Использование синтетических библиотек способно сильно расширить их разнообразие, так как снимаются ограничения, связанные с иммунным происхождением пула антител. Это теоретически позволяет отбирать высокоаффинные антитела (пико- и наномолярных аффиностей) к любым антигенам – консервативным белкам, неиммуногенным или токсичным веществам. Становится возможным получение антител, специфично распознающих различные посттрансляционные модификации и конформации одного и того же белка. Единожды сконструированная синтетическая библиотека может служить источником антител к сотням различных антигенов, включая аутоантигены, существенно сокращая временные и экономические затраты. Использование каркасных участков антител, обладающих низкой иммуногенностью и высокой стабильностью в растворах, позволяет изолировать клоны антител, обладающие необходимыми для терапевтического применения физико-химическими и иммунобиологическими свойствами [51].

Существует несколько основных подходов к созданию подобных библиотек, в зависимости от чего выделяют полусинтетические и полностью синтетические библиотеки.

Полусинтетические библиотеки конструируются на основании случайных комбинаций между хорошо экспрессирующимися и стабильными семействами VH и VL (такими как, например, VH-DP47, Vk-DPL3) с введенным в участки, опосредующие большинство взаимодействий с антигеном (CDR – complementary determining regions) дополнительным аминокислотным разнообразием. Таким образом, выбрав в качестве шаблона стабильное антитело необходимой видовой принадлежности – каркас, которое хорошо экспрессируется в клетках продуцента, и введя в его структуру заранее продуманное разнообразие последовательностей антигенсвязывающих областей, можно получить библиотеку антител с заданной структурой каркасного участка, но с различным сродством к разным антигенам. Последующие стадии селекции и при необходимости *in vitro* аффинного созревания делают рутинной операцию получения антител с наномолярной или даже пикомолярной аффинностью [52].

Ряд антител к широкому разнообразию мишеней (тиреопероксидаза, цитохромы P450, лактоферрин, кортизол, эритропоэтин, соматотропный гормон) получен нами с использованием монокаркасной синтетической библиотеки однодоменных антител. Суперпозиция структур этих антител (получены *in silico* методами молекулярного моделирования) показывает крайне высокую вариативность CDR3 петли, опосредующей большее количество взаимодействий с антигеном и рандомизированной по длине, и высокую стабильность каркаса (рис. 4, *а*).

Кроме этого, разнообразие CDR3 покрывает до 80% поверхности паратопа (рис. 4, *б*). Все изолированные клоны к разным мишеням сохраняют более чем 85% идентичность первичной последовательности и третичной структуры, что обуславливает подобие физико-химических свойств этих антител и значительно упрощает работу с ними.

В простейшем случае диверсификация осуществляется введением всего разнообразия аминокислотных остатков в CDR с помощью вырожденных кодонов NNK/NNS, которые покрывают все 20 основных аминокислот [53]. Данный способ диверсификации является наименее эффективным – многие клоны антител склонны к агрегации и не способны эффективно связывать антигены в виду большого количества нехарактерных для CDR аминокислотных остатков, таких как цистеин, изолейцин, метионин. Тем не менее подобные библиотеки, как, например, *Tomlinson I+J library*, могут являться источником высокоаффинных и специфичных клонов антител для научных исследований [54, 55].

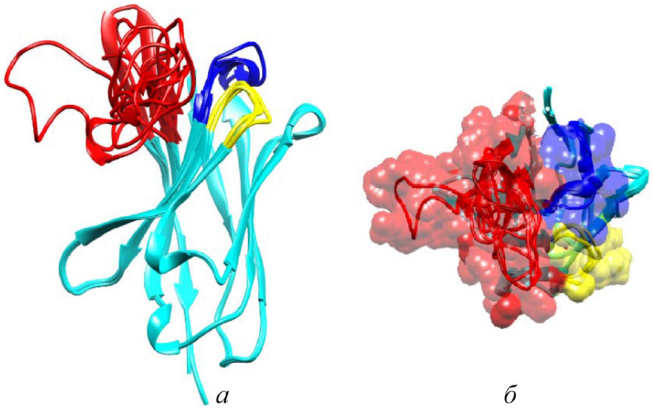


Рис. 4. Суперпозиция однодоменных антител, изолированных из библиотеки, созданной на основе одного каркаса:
(*а* – вид сбоку, *б* – вид сверху, жёлтые петли – CDR1, синие – CDR2, красные – CDR3)

Fig. 4. Single-domain antibodies structures from single framework library, superposition
(*a* – front view, *б* – side view, yellow loops – CDR1, blue loops – CDR2, red loops – CDR3)

Наиболее совершенным методом диверсификации является использование синтетических тринуклеотидов, что позволяет создавать библиотеки со строго контролируемым разнообразием аминокислотных остатков в каждой позиции и их соотношением, исключая присутствие таких аминокислот, как, например, цистеин и пролин в антигенсвязывающем сайте, и увеличивая количество ароматических и заряженных аминокислот, опосредующих большое количество взаимодействий [50].

В полностью синтетических библиотеках синтезируется ряд каркасных (FR – framework regions) участков, чередующихся с полностью рандомизированными CDR участками [56]. Наличие нескольких каркасных участков в совокупности с *in silico* сконструированными CDR участками позволяет одновременно покрыть все канонические классы антител и оптимизировать их структуру для достижения высокого уровня экспрессии в бактериальной системе и дисплея на поверхности бактериофагов.

Для определения аминокислотного разнообразия CDR участков антител, прошедших все стадии аффинного созревания, нами были проанализированы структуры разрешенных комплексов антител с антигенами, входящими в базу данных RCSF PDB (http://www.rcsb.org/, дата доступа 01.07.2016). Из более чем 120 тысяч структур 2,5 тысячи составляют антитела и их фрагменты. Наиболее представлены антитела в комплексе с белковыми молекулами (1112 депонированных структур) и пептидами (322). Антитела с низкомолекулярными веществами (176), углеводами (86) и нуклеиновыми кислотами (16) встречаются значительно реже.

После извлечения последовательностей CDR участков антител с помощью оригинального программного комплекса, написанного на языке Python, нами была определена общая частота включения различных аминокислотных участков в каждую из CDR петель (рис. 5).

Наиболее представлены в антигенсвязывающем участке аминокислотные остатки серина (S), тирозина (Y), глицина (G) и аспарагиновой кислоты (D). Возможно, тирозин и аспарагиновая кислота наилучшим образом подходят для реализации молекулярного узнавания [57], что и обуславливает селективное давление в ходе эволюции иммунной системы, которое привело к их преобладанию в данных регионах, а небольшие боковые цепи серина и глицина позволяют оптимальным образом разместить их в пространстве паратопа [58, 59].

На основании этой информации нами сконструирована синтетическая библиотека *Fab* фрагментов антител с серин\тирозин разнообразием во всех CDR. В CDR-H3 и CDR-L3 как наиболее значимые с точки зрения взаимодействий с антигенами было введено дополнительное разнообразие, кроме этого они были рандомизированы по длине (от 4 до 17 аминокислотных остатков).

Разнообразие (количество различных клонов антител в библиотеке) созданной библиотеки лимитируется эффективностью процесса переноса созданных синтетических генетических конструкций в клетки *E. coli*. Наиболее приемлемым на сегодняшний день является метод электро-

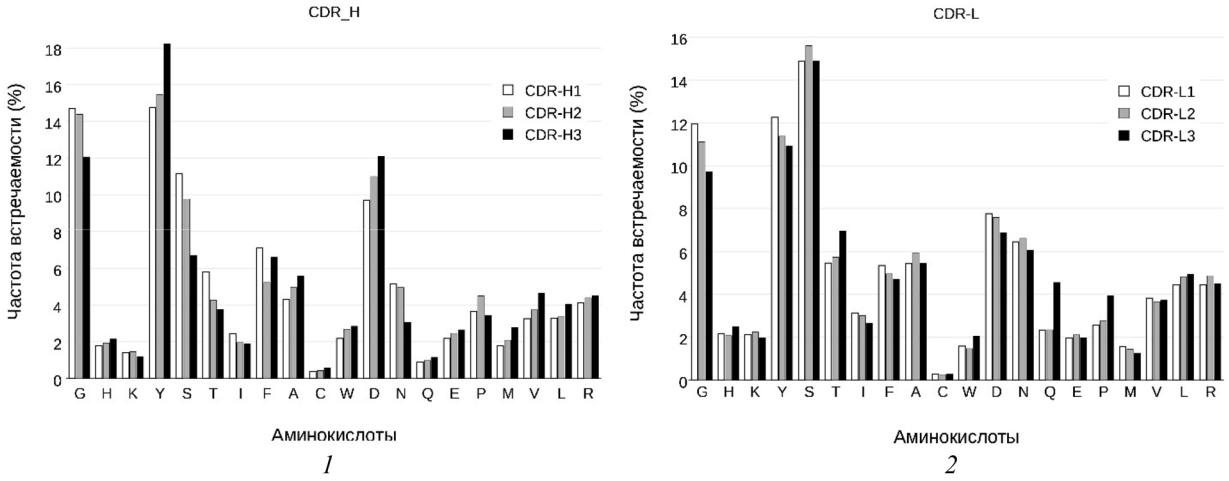


Рис. 5. Частота включения различных аминокислотных остатков по CDR последовательностям тяжелой (1) и легкой (2) цепей иммуноглобулинов

Fig. 5. Amino Acids diversity in CDR sequences of heavy (*1*) and light (*2*) chains of immunoglobulins

порации [60], эффективность которого на несколько порядков превышает эффективность химических методов. Так как теоретическое разнообразие, вводимое нами в CDR петли *Fab* фрагмента, составляет порядка 10^{16} и значительно превышает достигнутую эффективность электропорации ($1{,}2 \cdot 10^{10}$ КОЕ\мкг ДНК), можно сделать вывод, что большинство вариантов антител присутствует в ней в единственном числе, а значит, разнообразие библиотеки составляет порядка 10^{10}–10^{11}, что в большинстве случаев достаточно для получения высокоаффинных клонов антител с заданными свойствами.

Такой подход позволил получить библиотеки, способные служить источником антител к сотням антигенов, многие из них недоступны для натуральных библиотек. Преимущества, которые дает использование дисплейных методов для получения рекомбинантных антител с широким диапазоном свойств, позволили внедрить такие антитела в многочисленные диагностические системы [61].

Одним из современных направлений биоинженерии антител является создание узнающих модулей с pH-зависимым связыванием для терапевтического применения [62]. Моноклональные антитела к мембранным белкам взаимодействуют с мишенью только один раз и утилизируются в эндосомах, что уменьшает период их полувыведения и повышает требуемые дозировки препарата. Для создания антител с pH-зависимым связыванием сконструированы комбинаторные фаговые библиотеки *scFv* фрагментов с увеличенным количеством остатков гистидина в антиген-связывающих петлях [63]. Гистидин (pK_a~6,5) при физиологических значениях pH не имеет заряда и потенциально способен опосредовать большое количество взаимодействий с антигеном (формирование водородных связей, π-π стэкинг, катион-π взаимодействия) [64]. В кислой среде эндосом боковая цепь гистидина приобретает положительный заряд и взаимодействие с антигеном нарушается, что приводит к высвобождению антител обратно в плазму, где может происходить новое взаимодействие с рецепторами или растворимыми антигенами [62].

Использование негативной селекции для получения специфических антител к высокогомологичным антигенам. Наиболее ценной особенностью применения дисплейных методов является возможность создания антител с заданными параметрами связывания – узнающих определенные конформационные состояния белков и способных их индуцировать, региоспецифические антитела к интересующим исследователя конформационным эпитопам, антитела, различающие высокогомологичные белки, а также антитела, узнающие белок-белковые комплексы и стабилизирующие белок-белковые взаимодействия [65, 66]. Это становится возможным благодаря применению негативной или позитивной селекции, когда библиотека антител предварительно обедняется или соответственно обогащается клонами, способными связывать антигены заданной структуры.

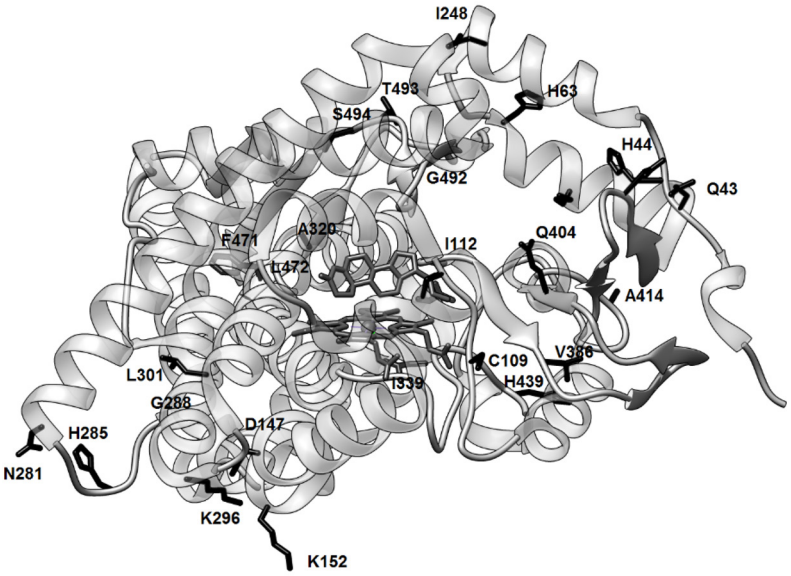


Рис. 6. Пространственная структура CYP11B2 (PDB ID: 4DVQ). Светло-серым цветом – укладка аминокислотной цепи, черным – аминокислотные остатки, отличающиеся от CYP11B1, темно-серым – гем и лиганд (11-дезоксикортикостерон)

Fig. 6. Spatial structure of CYP11B2 (PDB ID: 4DVQ). Light gray – laying of the amino acid chain, black – amino acid residues, different from CYP11B1, dark gray – heme and ligand (11-deoxy corticosterone)

С использованием подхода негативной селекции нами изолирован ряд клонов однодоменных антител человека заданной специфичности.

Цитохром P450 11B2 (альдестерон-синтаза) – CYP11B2 и цитохром P450 11B1 (стероид 11β-гидроксилаза) – CYP11B1 – ключевые ферменты биосинтеза минералокортикоидов и кортикостероидов [67]. Эти изоферменты обладают 93% идентичностью аминокислотной последовательности, однако этих нескольких аминокислотных замен достаточно для существенных функциональных отличий между ферментами [68].

Высокая степень идентичности последовательностей CYP11B2 и CYP11B1 затрудняет получение специфичных антител к конформационным эпитопам традиционной гибридомной технологией (рис. 6).

Относительные успехи были достигнуты только при использовании линейных синтетических пептидов в качестве иммуногена, однако изучение молекулярных механизмов различий в каталитической активности изоферментов требует наличия антител к конформационным эпитопам [69].

Для получения рекомбинантных антител нами использована комбинаторная фаговая библиотека однодоменных антител человека. Разнообразие данной библиотеки составляет 10^{10} независимых клонов, что сопоставимо с разнообразием В-лимфоцитов в иммунной системе. Это позволяет рассчитывать на получение антител с микро- и наномолярной аффинностью к белкам в *in vitro* системе в заданных условиях [18]. Данная библиотека сконструирована путем рандомизации CDR антигенсвязывающих петель с каркасного участка V3-23/D47 VH фрагмента антитела человека [19]. Такие антитела имеют ряд преимуществ как перед полноразмерными антителами, так и *Fab* и *scFv* фрагментами антител: малый размер (14 кДа), высокая термическая стабильность (сохраняют антигенсвязывающие свойства после нескольких циклов тепловой денатурации), высокий уровень экспрессии в бактериальной системе *E. coli*, возможность связывания антителами скрытых эпитопов и полостей.

С целью получения CYB11B2 специфических антител, не связывающих CYP11B1, нами был применен подход негативной селекции, заключающийся в предварительной инкубации библиотеки антител с иммобилизованным CYP11B1 для обеднения библиотеки клонами, обладающими нежелательной кросс-реактивностью. После четырех раундов биопэнинга 48 произвольно выбранных антител использовались для анализа связывания с CYP11B2 и CYP11B1 методом ИФА.

Согласно результатам ИФА, в пуле присутствуют как клоны антител, связывающие CYP11B1 и не связывающие CYP11B2, так и клоны с преобладающей аффинностью к CYP11B2 (рис. 7).

Анализ нуклеотидных последовательностей CDR-H3, определяющих уникальность клонов антител, показал существенное превалирование в фаговом пуле двух клонов, один из которых (G3) обладает необходимой антигенной специфичностью. Данное антитело было получено в бактериальной системе в препаративных количествах для анализа кинетических параметров связывания с антигеном.

Анализ кинетики взаимодействия с антигеном, проведенный с использованием метода биослойной интерферометрии на биосенсоре Blitz ForteBio [70], показал, что однодоменные антитела, иммобилизованные на protein A сенсоре, связывают CYP11B2 и CYP11B1 с практически идентичным значением k_{on}, однако отличатся по значению k_{off}, что, вероятно, и обуславливает отсутствие связывания в условиях проведения твердофазного иммуноферментного анализа (рис. 8, *а*)

Одним из требований к получаемым антителам является специфичность к конкретному эпитопу – участку связывания с редокс-партнером адренодоксином (Adx). Для анализа влияния присутствия Adx на взаимодействие антитела с CYP11B2 иммобилизованные на protein A сенсоре антитела G3 помещали в растворы CYP11B2, содержащие различное молярное соотношение Adx к CYP11B2 (от 2:1 до 1:2). Из представленных на сенсограмме данных видно, что повышение концентрации Adx в растворе уменьшает количество CYP11B2 связывающегося на сенсоре, что свидетельствует о конкурентном ингибировании этого связывания (рис. 8, *б*).

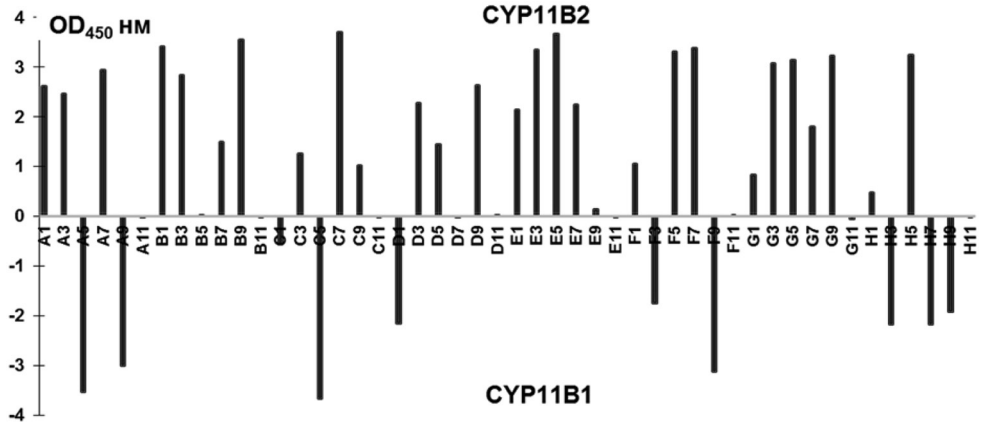


Рис. 7. Результаты ИФА скрининга клонов, полученных в результате селекции антител к CYB11B2 с негативной селекцией на CYP11B1

Fig. 7. ELISA data of anti-CYP11B2/CYP11B1 antibodies negative selection

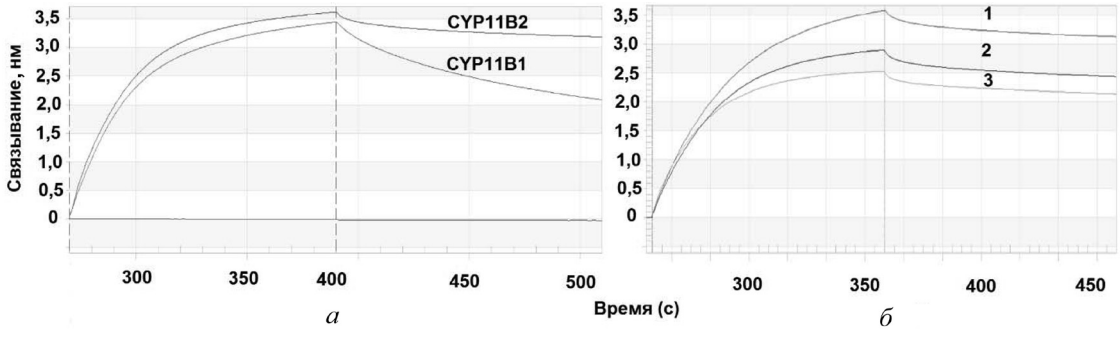


Рис. 8. Сенсограмма взаимодействия CYP11B2 и CYP11B1 с антителом G3, иммобилизованным на биосенсоре (*а*); взаимодействия CYP11B2 (1 нМ) с антителом G3 в присутствии различных концентраций адренодоксина (*1* – 0 нМ; *2* – 0,5 нМ; *3* – 2 нМ) – (*б*)

Fig. 8. Sensogram of antibody G3 – CYP11B2/CYP11B1 interaction – (*a*); interaction of CYP11B2 (1 nM) and G3 antibody in the presence of adrenodoxin (*1* – 0 nM; *2* – 0.5 nM; *3* – 2 nM) – (*б*)

Выводы. С применением дисплейных методов создание антител с аффинностью до 10^{-12} М становится обыденной процедурой. Значения аффинности могут значительно превосходить таковые у антител, полученных с применением иммунизации, так как они ограничены ~10^{-10} М вследствие природного механизма активации В-лимфоцитов.

Тщательный контроль условий скрининга и селекции в дисплейных методах позволяет отбирать антитела специфичные к различным конформациям и эпитопам антигена, что находит применение в научно-исследовательских и диагностических целях. Перспективным представляется использование, связанное со специфичным узнаванием белка с определенными посттрансляционными модификациями, единичными аминокислотными заменами или в определенном конформационном состоянии.

Привлекательной является возможность полного отказа от трудозатратной гибридомной технологии, когда с использованием фагового дисплея и методов генетической инженерии появляется возможность клонировать гены антител, используя образцы крови иммунизированных доноров. Синтетические библиотеки позволяют упростить и эту процедуру, используя в высокопроизводительном скрининге всего лишь одну библиотеку для поиска аффинных вариантов антител.

На сегодняшний день проходят клинические испытания более 60 препаратов терапевтических антител, полученных с помощью фагового дисплея, однако практически все узнающие модули были получены всего несколькими компаниями – MorphoSys, Dyax, Cambridge Antibody Technology, имеющими в своем портфолио комбинаторные библиотеки антител, такие как Ylanthia®, HuCAL®, однако они коммерчески недоступны ни для академических институтов, ни для фармацевтических предприятий [51, 71, 72]. Это делает необходимым освоение данной технологии и конструирование собственных комбинаторных библиотек антител.

Значительный опыт работы в области белковой инженерии и биоинформатики позволил создать в Институте биоорганической химии НАН Беларуси ряд технологических платформ для получения рекомбинантных антител методами фагового дисплея. С использованием негативной селекции для удаления вариантов антител, обладающих нежелательной кросс-реактивностью, были получены аффинные антитела к ряду мишеней, имеющих прикладное значение – альдостерон-синтазе, эритропоэтину, соматотропному гормону, тиреопероксидазе человека.

Список использованных источников

1. Recent advances in the application of antibodies as therapeutics / R. E. Burden [et al.] // Future Med. Chem. – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 73–86.

2. Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips / C. A. Borrebaeck // Immunol. Today. – 2000. – Vol. 21, № 8. – P. 379–382.

3. Rodgers, K. R. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions / K. R. Rodgers, R. C. Chou // Biotechnol. Adv. – 2016. – Vol. 34, № 6. – P. 1149–1158.

4. Ecker, D. M. The therapeutic monoclonal antibody market / D. M. Ecker, S. D. Jones, H. L. Levine // MAbs. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 9–14.

5. Antibodies for profiling the human proteome-The Human Protein Atlas as a resource for cancer research / A. Asplund [et al.] // Proteomics. – 2012. – Vol. 12, № 13. – P. 2067–2077.

6. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas / M. Uhlen [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2010. – Vol. 28, № 12. – P. 1248–1250.

7. Buchner, J. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in Escherichia coli / J. Buchner, R. Rudolph // Biotechnology (N Y). – 1991. – Vol. 9, № 2. – P. 157–162.

8. Rousseaux, J. Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')2 fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses / J. Rousseaux, R. Rousseaux-Prevost, H. Bazin // J. Immunol. Methods. – 1983. – Vol. 64, № 1–2. – P. 141–146.

9. Gaudreault, J. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration / J. Gaudreault [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – Vol. 46, № 2. – P. 726–733.

10. Single-chain antigen-binding proteins / R. E. Bird [et al.] // Science. – 1988. – Vol. 242, № 4877. – P. 423–426.

11. Recombinant Immunotoxin 4D5scFv-PE40 for Targeted Therapy of HER2-Positive Tumors / E. A. Sokolova [et al.] // Acta Naturae. – 2015. – Vol. 7, № 4. – P. 93–96.

12. Phase IB trial of chimeric antidisialoganglioside antibody plus interleukin 2 for melanoma patients / M. R. Albertini [et al.] // Clin. Cancer Res. – 1997. – Vol. 3, № 8. – P. 1277–1288.

13. Vial, T. Immune-mediated side-effects of cytokines in humans / T. Vial, J. Descotes // Toxicology. – 1995. – Vol. 105, № 1. – P. 31–57.

14. An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells / C. Heuser [et al.] // Br. J. Cancer. – 2003. – Vol. 89, № 6. – P. 1130–1139.

15. Penichet, M. L. An IgG3-IL-2 fusion protein recognizing a murine B cell lymphoma exhibits effective tumor imaging and antitumor activity / M. L. Penichet, E. T. Harvill, S. L. Morrison // J. Interferon Cytokine Res. – 1998. – Vol. 18, № 8. – P. 597–607.

16. Clementschitsch, F. Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts / F. Clementschitsch, K. Bayer // Microb. Cell Fact. – 2006. – Vol. 5. P. 19.

17. Development of CYB5-fusion monitoring system for efficient periplasmic expression of multimeric proteins in Escherichia coli / D. Dormeshkin [et al.] // Protein Expr. Purif. – 2016. – Vol. 128. – P. 60–66.

18. The crystal structure of a llama heavy chain variable domain / S. Spinelli [et al.] // Nat. Struct. Biol. – 1996. – Vol. 3, № 9. – P. 752–757.

19. Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks / S. Zielonka [et al.] // MAbs. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 15–25.

20. Rouet, R. Generation of human single domain antibody repertoires by Kunkel mutagenesis / R. Rouet, K. Dudgeon, D. Christ // Methods Mol. Biol. – 2012. – Vol. 907. – P. 195–209.

21. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target / J. De Vos [et al.] // Expert Opin. Biol. Ther. – 2013. – Vol. 13, № 8. – P. 1149–1160.

22. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis / M. Van Roy [et al.] // Arthritis Res. Ther. – 2015. – Vol. 17. – P. 135.

23. Holz, J. B. The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura / J. B. Holz // Transfus. Apher. Sci. – 2012. – Vol. 46, № 3. – P. 343–346.

24. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection / L. Detalle [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2015. – Vol. 60, № 1. – P. 6–13.

25. Detection of carcinoembryonic antigen using single-domain or full-size antibodies stained with quantum dot conjugates / G. Rousserie [et al.] // Anal. Biochem. – 2015. – Vol. 478. – P. 26–32.

26. Schroeder, K. L. Graphene Quantum Dots for Theranostics and Bioimaging / K. L. Schroeder, R. V. Goreham, T. Nann // Pharm. Res. – 2016. – Vol. 33, № 10. – P. 2337–2357.

27. Directed evolution of PDZ variants to generate high-affinity detection reagents / M. Ferrer [et al.] // Protein Eng. Des. Sel. – 2005. – Vol. 18, № 4. – P. 165–173.

28. Hosse, R. J. A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition / R. J. Hosse, A. Rothe, B. E. Power // Protein Sci. – 2006. – Vol. 15, № 1. – P. 14–27.

29. Sedgwick, S. G. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework / S. G. Sedgwick, S. J. Smerdon // Trends Biochem. Sci. – 1999. – Vol. 24, № 8. – P. 311–316.

30. Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding affibody molecule / M. Friedman [et al.] // J. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 376, № 5. – P. 1388–1402.

31. Kohler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Kohler, C. Milstein // Nature. – 1975. – Vol. 256, № 5517. – P. 495–497.

32. Ruberti, F. Cloning and expression of an anti-nerve growth factor (NGF) antibody for studies using the neuroantibody approach / F. Ruberti, A. Bradbury, A. Cattaneo // Cell. Mol. Neurobiol. – 1993. – Vol. 13, № 5. – P. 559–568.

33. An improved method for generating single-chain antibodies from hybridomas / P. J. Nicholls [et al.] // J. Immunol. Methods. – 1993. – Vol. 165, № 1. – P. 81–91.

34. Structure-based affinity maturation of a chimeric anti-ricin antibody C4C13 / L. Luo [et al.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2014. – Vol. 32, № 3. – P. 416–423.

35. Ikonomova, S. P. A simple and robust approach to immobilization of antibody fragments / S. P. Ikonomova, Z. He, A. J. Karlsson // J. Immunol. Methods. – 2016. – Vol. 435. – P. 7–16.

36. Toleikis, L. Cloning single-chain antibody fragments (ScFv) from hyrbidoma cells / L. Toleikis, A. Frenzel // Methods Mol. Biol. – 2012. – Vol. 907. № – P. 59–71.

37. Generation and characterization of biotinylated recombinant Fab antibody fragment against cortisol / D. O. Dormeshkin [et al.] // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2016. – Vol. 42, № 1. – P. 7.

38. Tomita, M. Hybridoma technologies for antibody production / M. Tomita, K. Tsumoto // Immunotherapy. – 2011. – Vol. 3, № 3. – P. 371–380.

39. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface / G. P. Smith // Science. – 1985. – Vol. 228, № 4705. – P. 1315–1317.

40. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies / A. R. Bradbury [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2011. – Vol. 29, № 3. – P. 245–254.

41. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization / D. J. Schofield [et al.] // Genome Biol. – 2007. – Vol. 8, № 11. – P. R254.

42. Carmen, S. Concepts in antibody phage display / S. Carmen, L. Jermutus // Brief. Funct. Genomic Proteomic. – 2002. – Vol. 1, № 2. – P. 189–203.

43. Significant impact of single N-glycan residues on the biological activity of Fc-based antibody-like fragments / J. Jez [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287, № 29. – P. 24313–24319.

44. Watkins, N. A. Introduction to antibody engineering and phage display / N. A. Watkins, W. H. Ouwehand // Vox Sang. – 2000. – Vol. 78, № 2. – P. 72–79.

45. Griffiths, A. D. Strategies for selection of antibodies by phage display / A. D. Griffiths, A. R. Duncan // Curr. Opin. Biotechnol. – 1998. – Vol. 9, № 1. – P. 102–108.

46. Making antibody fragments using phage display libraries / T. Clackson [et al.] // Nature. – 1991. – Vol. 352, № 6336. – P. 624–628.

47. Sok, D. HIV Broadly Neutralizing Antibodies: Taking Good Care Of The 98 / D. Sok, D. R. Burton // Immunity. – 2016. – Vol. 45, № 5. – P. 958–960.

48. Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: reactivity, specificity and epitope recognition / S. Zampieri [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2003. – Vol. 60, № 3. – P. 588–598.

49. Hoogenboom, H. R. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro / H. R. Hoogenboom, G. Winter // J. Mol. Biol. – 1992. – Vol. 227, № 2. – P. 381–388.

50. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides / A. Knappik [et al.] // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 296, № 1. – P. 57–86.

51. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties / T. Tiller [et al.] // MAbs. – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 445–470.

52. The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies / C. Rothe [et al.] // J. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 376, № 4. – P. 1182–1200.

53. Construction of a Semisynthetic Human VH Single-Domain Antibody Library and Selection of Domain Antibodies against alpha-Crystalline of Mycobacterium tuberculosis / N. H. Hairul Bahara [et al.] // J Biomol Screen. – 2016. – Vol. 21, № 1. – P. 35–43.

54. Eteshola, E. Isolation of scFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display / E. Eteshola // J. Immunol. Methods. – 2010. – Vol. 358, № 1–2. – P. 104–10.

55. Development of a novel human scFv against EGFR L2 domain by phage display technology / L. Rahbarnia [et al.] // Curr. Pharm. Des. – 2016. – Vol. № – P.

56. Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3 / R. Rauchenberger [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, № 40. – P. 38194–38205.

57. Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule / E. A. Padlan // Mol Immunol. – 1994. – Vol. 31, № 3. – P. 169–217.

58. Padlan, E. A. Does base composition help predispose the complementarity-determining regions of antibodies to hypermutation? / E. A. Padlan // Mol. Immunol. – 1997. – Vol. 34, № 11. – P. 765–770.

59. Tyrosine plays a dominant functional role in the paratope of a synthetic antibody derived from a four amino acid code / F. A. Fellouse [et al.] // J. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 357, № 1. – P. 100–114.

60. Ho, S. Y. Electroporation of cell membranes: a review / S. Y. Ho, G. S. Mittal // Crit. Rev. Biotechnol. – 1996. – Vol. 16, № 4. – P. 349–362.

61. Phage display antibodies for diagnostic applications / N. H. Hairul Bahara [et al.] // Biologicals. – 2013. – Vol. 41, № 4. – P. 209–216.

62. Igawa, T. pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality / T. Igawa, F. Mimoto, K. Hattori // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – Vol. 1844, № 11. – P. 1943–1950.

63. De novo isolation of antibodies with pH-dependent binding properties / P. Bonvin [et al.] // MAbs. – 2015. – Vol. 7, № 2. – P. 294–302.

64. The multiple roles of histidine in protein interactions / S. M. Liao [et al.] // Chem Cent J. – 2013. – Vol. 7, № 1. – P. 44.

65. Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformation-specific effector proteins / S. S. Rizk [et al.] // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 18, № 4. – P. 437–442.

66. Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation / S. Uysal [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. U S A. – 2009. – Vol. 106, № 16. – P. 6644–6649.

67. Rainey, W. E. Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase / W. E. Rainey // Mol. Cell. Endocrinol. – 1999. – Vol. 151, № 1–2. – P. 151–60.

68. Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition / N. Strushkevich [et al.] // Mol. Endocrinol. – 2013. – Vol. 27, № 2. – P. 315–324.

69. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2 / C. E. Gomez-Sanchez [et al.] // Mol. Cell. Endocrinol. – 2014. – Vol. 383, № 1–2. – P. 111–117.

70. Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions / Wallner, J. [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2013. – Vol. 72, № – P. 150–154.

71. HuCAL PLATINUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and superior performance in mammalian expression systems / J. Prassler [et al.] // J. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 413, № 1. – P. 261–278.

72. Frenzel, A. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy / A. Frenzel, T. Schirrmann, M. Hust // MAbs. – 2016. – Vol. 8, № 7. – P. 1177–1194.

References

1. Burden R. E., Caswell J., Fay F., Scott C. J., “Recent advances in the application of antibodies as therapeutics”, *Future Medicinal Chemistry*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 73–86.

2. Borrebaeck C. A., “Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips”, *Immunology Today*, 2000, vol. 21, no. 8, pp. 379–382.

3. Rodgers K. R., Chou R. C., "Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions", *Biotechnology Advances*, 2016, vol. 34, no. 6, pp. 1149–1158.

4. Ecker D. M., Jones S. D., Levine H. L., "The therapeutic monoclonal antibody market", *MAbs*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 9–14.

5. Asplund A., Edqvist P. H., Schwenk J. M., Ponten F., "Antibodies for profiling the human proteome-The Human Protein Atlas as a resource for cancer research", *Proteomics*, 2012, vol. 12, no. 13, pp. 2067–2077.

6. Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonasson K., Forsberg M., Zwahlen M., Kampf C., Wester K., Hober S., Wernerus H., Bjorling L., Ponten F., "Towards a knowledge-based Human Protein Atlas", *Nature Biotechnology*, 2010, vol. 28, no. 12, pp. 1248–1250.

7. Buchner J., Rudolph R., "Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in Escherichia coli", *Biotechnology (N Y)*, 1991, vol. 9, no. 2, pp. 157–162.

8. Rousseaux, J., Rousseaux-Prevost R., Bazin H., "Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')2 fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses", *Journal of Immunological Methods*, 1983, vol. 64, no. 1–2, pp. 141–146.

9. Gaudreault J., Fei D., Rusit J., Suboc P., Shiu V., "Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2005, vol. 46, no. 2, pp. 726–733.

10. Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S., Whitlow M., "Single-chain antigen-binding proteins", *Science*, 1988, vol. 242, no. 4877, pp. 423–426.

11. Sokolova E. A., Stremovskiy O. A., Zdobnova T. A., Balalaeva I. V., Deyev S. M., "Recombinant Immunotoxin 4D5scFv-PE40 for Targeted Therapy of HER2-Positive Tumors", *Acta Naturae*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 93–96.

12. Albertini M. R., Hank J. A., Schiller J. H., Khorsand M., Borchert A. A., Gan J., Bechhofer R., Storer B., Reisfeld R. A., Sondel P. M., "Phase IB trial of chimeric antidisialoganglioside antibody plus interleukin 2 for melanoma patients", *Clinical Cancer Research*, 1997, vol. 3, no. 8, pp. 1277–1288.

13. Vial T., Descotes J., "Immune-mediated side-effects of cytokines in humans", *Toxicology*, 1995, vol. 105, no. 1, pp. 31–57.

14. Heuser C., Ganser M., Hombach A., Brand H., Denton G., Hanisch F. G., Abken H., "An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells", *British Journal of Cancer*, 2003, vol. 89, no. 6, pp. 1130–1139.

15. Penichet M. L., Harvill E. T., Morrison S. L., "An IgG3-IL-2 fusion protein recognizing a murine B cell lymphoma exhibits effective tumor imaging and antitumor activity", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1998, vol. 18, no. 8, pp. 597–607.

16. Clementschitsch F., Bayer K., "Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts", *Microbial Cell Factories*, 2006, no. 5, p. 19.

17. Dormeshkin D., Gilep A., Sergeev G., Usanov S., "Development of CYB5-fusion monitoring system for efficient periplasmic expression of multimeric proteins in Escherichia coli", *Protein expression and purification*, 2016, vol. 128, pp. 60–66.

18. Spinelli S., Frenken L., Bourgeois D., de Ron L., Bos W., Verrips T., Anguille C., Cambillau C., Tegoni M., "The crystal structure of a llama heavy chain variable domain", *Nature Structural Biology*, 1996, vol. 3, no. 9, pp. 752–757.

19. Zielonka S., Empting M., Grzeschik J., Konning D., Barelle C.J., Kolmar H., "Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks", MAbs, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 15–25.

20. Rouet R., Dudgeon K., Christ D., "Generation of human single domain antibody repertoires by Kunkel mutagenesis", *Methods in Molecular Biology*, 2012, vol. 907, pp. 195–209.

21. De Vos J., Devoogdt N., Lahoutte T., Muyldermans S., "Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target", *Expert opinion on biological therapy*, 2013, vol. 13, no. 8, pp. 1149–1160.

22. Van Roy M., Ververken C., Beirnaert E., Hoefman S., Kolkman J., Vierboom M., Breedveld E., t Hart B., Poelmans S., Bontinck L., Hemeryck A., Jacobs S., Baumeister J., Ulrichts H., "The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis", *Arthritis research & therapy*, 2015, vol. 17, p. 135.

23. Holz J. B., "The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura", *Transfusion and apheresis science*, 2012, vol. 46, no. 3, pp. 343–346.

24. Detalle L., Stohr T., Palomo C., Piedra P.A., Gilbert B.E., Mas V., Millar A., Power U.F., Stortelers C., Allosery K., Melero J.A., Depla E., "Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 6–13.

25. Rousserie G., Grinevich R., Brazhnik K., Even-Desrumeaux K., Reveil B., Tabary T., Chames P., Baty D., Cohen J. H., Nabiev I., Sukhanova A., "Detection of carcinoembryonic antigen using single-domain or full-size antibodies stained with quantum dot conjugates", *Analytical Biochemistry*, 2015, vol. 478, pp. 26–32.

26. Schroeder K. L., Goreham R. V., Nann T., "Graphene Quantum Dots for Theranostics and Bioimaging", *Pharmaceutical Research*, 2016, vol. 33, no. 10, pp. 2337–2357.

27. Ferrer M., Maiolo J., Kratz P., Jackowski J. L., Murphy D. J., Delagrave S., Inglese J., "Directed evolution of PDZ variants to generate high-affinity detection reagents", *Protein Engineering Design and Selection*, 2005, vol. 18, no. 4, pp. 165–173.

28. Hosse R. J., Rothe A., Power B. E., "A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition", *Protein Science*, 2006, vol. 15, no. 1, pp. 14–27.

29. Sedgwick S. G., Smerdon S. J., "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework", *Trends in biochemical sciences*, 1999, vol. 24, no. 8, pp. 311–316.

30. Friedman M., Orlova A., Johansson E., Eriksson T. L., Hoiden-Guthenberg I., Tolmachev V., Nilsson F. Y., Stahl S., "Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding affibody molecule", *Journal of Molecular Biology*, 2008, vol. 376, no. 5, pp. 1388–1402.

31. Kohler G., Milstein C., "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature*, 1975, vol. 256, no. 5517, pp. 495–497.

32. Ruberti F., Bradbury A., Cattaneo A., "Cloning and expression of an anti-nerve growth factor (NGF) antibody for studies using the neuroantibody approach", *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1993, vol. 13, no. 5, pp. 559–568.

33. Nicholls P. J., Johnson V. G., Blanford M. D., Andrew S. M., "An improved method for generating single-chain antibodies from hybridomas", *Journal of Immunological Methods*, 1993, vol. 165, no. 1, pp. 81–91.

34. Luo L., Luo Q., Guo L., Lv M., Lin Z., Geng J., Li X., Li Y., Shen B., Qiao C., Feng J., "Structure-based affinity maturation of a chimeric anti-ricin antibody C4C13", *Journal Of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2014, vol. 32, no. 3, pp. 416–423.

35. Ikonomova S. P., He Z., Karlsson A. J., "A simple and robust approach to immobilization of antibody fragments", *Journal of Immunological Methods*, 2016, vol. 435, pp. 7–16.

36. Toleikis L., Frenzel A., "Cloning single-chain antibody fragments (ScFv) from hyrbidoma cells", *Methods in Molecular Biology*, 2012, vol. 907, pp. 59–71.

37. Dormeshkin D. O., Svirid A. V., Gilep A. A., Sciridov O. V., Usanov S. A., "Generation and characterization of biotinylated recombinant Fab antibody fragment against cortisol", *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2016, vol. 42, no. 1, p. 7.

38. Tomita M., Tsumoto K., "Hybridoma technologies for antibody production", *Immunotherapy*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 371–380.

39. Smith G. P., "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", *Science*, 1985, vol. 228, no. 4705, pp. 1315–1317.

40. Bradbury A. R., Sidhu S., Dubel S., McCafferty J., "Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies", *Nature Biotechnology*, 2011, vol. 29, no. 3, pp. 245–254.

41. Schofield D. J., Pope A. R., Clementel V., Buckell J., Chapple S., Clarke K. F., Conquer J. S., Crofts A. M., Crowther S. R., Dyson M. R., Flack G., Griffin G. J., Hooks Y., Howat W. J., Kolb-Kokocinski A., Kunze S., Martin C. D., Maslen G. L., Mitchell J. N., O'Sullivan M., Perera R. L., Roake W., Shadbolt S. P., Vincent K. J., Warford A., Wilson W. E., Xie J., Young J. L., McCafferty J., "Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization", *Genome Biology*, 2007, vol. 8, no. 11, p. R254.

42. Carmen S., Jermutus L., "Concepts in antibody phage display", *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 2002, vol. 1, no. 2, pp. 189–203.

43. Jez J., Antes B., Castilho A., Kainer M., Wiederkum S., Grass J., Ruker F., "Woisetschlager M., Steinkellner H. Significant impact of single N-glycan residues on the biological activity of Fc-based antibody-like fragments", *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no. 29, pp. 24313–24319.

44. Watkins N. A., Ouwehand W. H., "Introduction to antibody engineering and phage display", *Vox Sanguinis*, 2000, vol. 78, no. 2, pp. 72–79.

45. Griffiths A. D., Duncan A. R., "Strategies for selection of antibodies by phage display", *Current opinion in biotechnology*, 1998, vol. 9, no. 1, pp. 102–108.

46. Clackson T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Winter G., "Making antibody fragments using phage display libraries", Nature, 1991, vol. 352, no. 6336, pp. 624–628.

47. Sok D., Burton D. R., "HIV Broadly Neutralizing Antibodies: Taking Good Care Of The 98", Immunity, 2016, vol. 45, no. 5, pp. 958–960.

48. Zampieri S., Mahler M., Bluthner M., Qiu Z., Malmegrim K., Ghirardello A., Doria A., van Venrooij W. J., Raats J. M., "Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: reactivity, specificity and epitope recognition", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, vol. 60, no. 3, pp. 588–598.

49. Hoogenboom H. R., Winter G., "By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro", *Journal of Molecular Biology*, 1992, vol. 227, no. 2, pp. 381–388.

50. Knappik A., Ge L., Honegger A., Pack P., Fischer M., Wellnhofer G., Hoess A., Wolle J., Pluckthun A., Virnekas B., "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides", *Journal of Molecular Biology*, 2000, vol. 296, no. 1, pp. 57–86.

51. Tiller T., Schuster I., Deppe D., Siegers K., Strohner R., Herrmann T., Berenguer M., Poujol D., Stehle J., Stark Y., Hessling M., Daubert D., Felderer K., Kaden S., Kolln J., Enzelberger M., Urlinger S., "A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties", *MAbs*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 445–470.

52. Rothe C., Urlinger S., Lohning C., Prassler J., Stark Y., Jager U., Hubner B., Bardroff M., Pradel I., Boss M., Bittlingmaier R., Bataa T., Frisch C., Brocks B., Honegger A., Urban M., "The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies", *Journal of Molecular Biology*, 2008, vol. 376, no. 4, pp. 1182–1200.

53. Hairul Bahara N. H., Chin S. T., Choong Y. S., Lim T. S., "Construction of a Semisynthetic Human VH Single-Domain Antibody Library and Selection of Domain Antibodies against alpha-Crystalline of Mycobacterium tuberculosis", *Journal of Biomolecular Screening*, 2016. vol. 21, no. 1, pp. 35–43.

54. Eteshola E., "Isolation of scFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display", *Journal of Immunological Methods*, 2010, vol. 358, no. 1–2, pp. 104–110.

55. Rahbarnia L., Farajnia S., Babaei H., Majidi J., Veisi K., Khosroshahi S. A., Tanomand A., "Development of a novel human scFv against EGFR L2 domain by phage display technology", *Current Pharmaceutical Design*, 2016, vol. 22, sep. 28.

56. Rauchenberger R., Borges E., Thomassen-Wolf E., Rom E., Adar R., Yaniv Y., Malka M., Chumakov I., Kotzer S., Resnitzky D., Knappik A., Reiffert S., Prassler J., Jury K., Waldherr D., Bauer S., Kretzschmar T., Yayon A., Rothe C., "Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3", *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 40, pp. 38194–38205.

57. Padlan E. A., "Anatomy of the antibody molecule", *Molecular Immunology*, 1994, vol. 31, no. 3, pp. 169–217.

58. Padlan E. A., "Does base composition help predispose the complementarity-determining regions of antibodies to hypermutation?", *Molecular Immunology*, 1997, vol. 34, no. 11, pp. 765–770.

59. Fellouse F. A., Barthelemy P. A., Kelley R. F., Sidhu S. S., "Tyrosine plays a dominant functional role in the paratope of a synthetic antibody derived from a four amino acid code", *Journal of Molecular Biology*, 2006, vol. 357, no. 1, pp. 100–114.

60. Ho S. Y., Mittal G. S., "Electroporation of cell membranes: a review", *Critical Reviews In Biotechnology*, 1996, vol. 16, no. 4, pp. 349–362.

61. Hairul Bahara N. H., Tye G. J., Choong Y. S., Ong E. B., Ismail A., Lim T. S., "Phage display antibodies for diagnostic applications", *Biologicals*, 2013, vol. 41, no. 4, pp. 209–216.

62. Igawa T., Mimoto F., Hattori K., "pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality", *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, vol. 1844, no. 11, pp. 1943–1950.

63. Bonvin P., Venet S., Fontaine G., Ravn U., Gueneau F., Kosco-Vilbois M., Proudfoot A. E., Fischer N., "De novo isolation of antibodies with pH-dependent binding properties", *MAbs*, 2015, vol. 7, no. 2, pp. 294–302.

64. Liao S. M., Du Q. S., Meng J. Z., Pang Z. W., Huang R. B., "The multiple roles of histidine in protein interactions", *Chemistry Central Journal*, 2013, vol. 7, no. 1, p. 44.

65. Rizk S. S., Paduch M., Heithaus J. H., Duguid E. M., Sandstrom A., Kossiakoff A. A., "Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformation-specific effector proteins", *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, vol. 18, no. 4, pp. 437–442.

66. Uysal S., Vasquez V., Tereshko V., Esaki K., Fellouse F.A., Sidhu S. S., Koide S., Perozo E., Kossiakoff A., "Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, vol. 106, no. 16, pp. 6644–6649.

67. Rainey W. E., "Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, vol. 151, no. 1–2, pp. 151–160.

68. Strushkevich N., Gilep A. A., Shen L., Arrowsmith C. H., Edwards A. M., Usanov S. A., Park H. W., "Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition", *Molecular Endocrinology*, 2013, vol. 27, no. 2, pp. 315–324.

69. Gomez-Sanchez C. E., Qi X., Velarde-Miranda C., Plonczynski M. W., Parker C. R., Rainey W., Satoh F., Maekawa T., Nakamura Y., Sasano H., Gomez-Sanchez E. P., "Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, vol. 383, no. 1–2, pp. 111–117.

70. Wallner J., Lhota G., Jeschek D., Mader A., Vorauer-Uhl K., "Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, vol. 72, pp. 150–154.

71. Prassler J., Thiel S., Pracht C., Polzer A., Peters S., Bauer M., Norenberg S., Stark Y., Kolln J., Popp A., Urlinger S., Enzelberger M., "HuCAL PLATINUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and superior performance in mammalian expression systems", *Journal of Molecular Biology*, 2011, vol. 413, no. 1, pp. 261–278.

72. Frenzel A., Schirrmann T., Hust M., "Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy", Mabs, 2016, vol.8, no. 7, pp. 1177–1194.

Информация об авторах

Дормешкин Дмитрий Олегович – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dormeshkin@gmail.com.

Бричко Екатерина Андреевна – студент, Белорусский государственный университет (просп. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kate.bri13@gmail.com.

Гилеп Андрей Александрович – канд. хим. наук, зав. отделом молекулярных биотехнологий, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

Усанов Сергей Александрович – член-кор., д-р хим. наук, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

Для цитирования

Фаговый дисплей в конструировании антител с заданными свойствами /Д.О. Дормешкин [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 93–110.

Information about the authors

Dormeshkin Dmitri Olegovich – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Kuprevich Str., 220141, Misnk, Republic of Belarus). E-mail: dormeshkin@gmail.com.

Brichko Ekaterina Andreevna – Student, Belarusian State University (4 Nezavisimosti Ave., 220141, Minsk, Republic of Belarus). Email: kate.bri13@gmail.com.

Gilep Andrei Aleksandrovich – Ph.D. (Chemistry), Head of the Department of molecular biotechnologies, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

Usanov Sergei Aleksandrovich – Corr. Member of the National Academy of Sciences, D. Sc. (Chemistry), Professor, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Kuprevich Str., 220141, Misnk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

For citation

Dormeshkin D. O., Brichko E. A., Gilep A. A., Usanov S. A. Phage display in engineering of antibodies with desired properties. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 93–110. (In Russian).

ISSN 0002-3590(print.)
УДК 547.32+547.46

Поступила в редакцию 23.09.2016
Received 23.09.2016

M. P. Bei, A. P. Yuvchenko, O. V. Sokol

The Institute of Chemistry of New Materials of the Nationa Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF NEW DERIVATIVES OF MALEOPIMARIC AND CITRACONOPIMARIC ACIDS

The review article summarizes data on synthesis of new derivatives of maleopimaric acid (the most available diterpenoid acid, isolated from maleated rosin) – esters, amides, imides, imido amides, imido esters, diimido acids etc. and of oxygen- and nitrogen containing derivatives of previously unknown citraconopimaric acid. The article mainly covers the literature data since 2000 year as well as work carried out in the Institute of Chemistry of New Materials of NAS of Belarus.

Keywords: rosin, terpenoids, maleopimaric acid, citraconopimaric acid, esters, amides, imides.

М. П. Бей, А. П. Ювченко, О. В. Сокол

Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МАЛЕОПИМАРОВОЙ И ЦИТРАКОНОПИМАРОВОЙ КИСЛОТ

Представлен обобщающий и систематизирующий обзор данных по синтезу производных малеопимаровой кислоты (наиболее доступной дитерпеноидной кислоты, выделяемой из малеинизированной канифоли) – эфиров, амидов, имидов, имидоамидов, имидоэфиров, диимидокислот и др., а также кислород- и азотсодержащих производных ранее неизвестной цитраконопимаровой кислоты. Приведены литературные данные с 2000 г., а также работы, выполненные в Институте химии новых материалов НАН Беларуси.

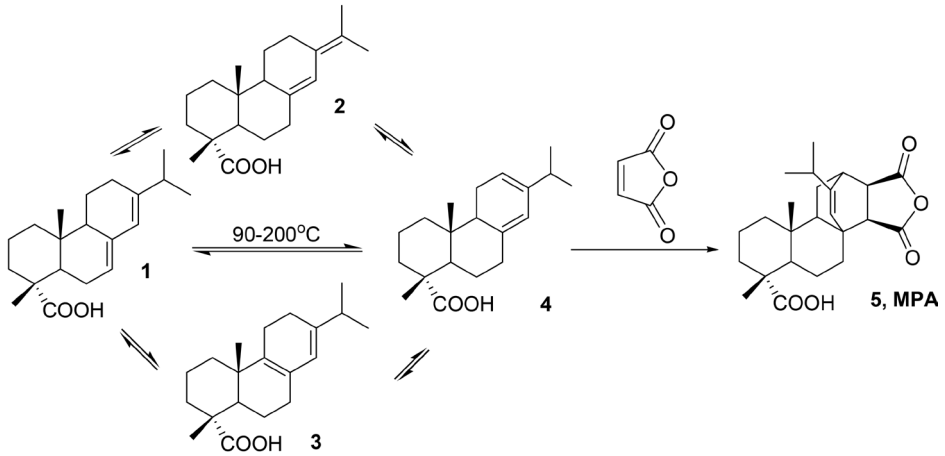
Ключевые слова: канифоль, терпеноиды, малеопимаровая кислота, цитраконопимаровая кислота, сложные эфиры, амиды, имиды.

Terpenes from wood resins (essential oils and rosins) constitute one of the valuable part of plant resources and main source of terpene substances. In the last decades, the intensive studies were directed toward the development of new methods for valuable chemical products preparation from renewable raw materials and the individual substances that can be isolated or synthesized from rosin are of special interest. The most promising approach to the preparation of individual diterpene derivatives is to modify rosin in particular by active dienophiles. The most available individual substance thus obtained is maleopimaric acid (MPA), isolated from rosin-maleic anhydride adduct (RMA). This compound is used for the production of printing inks, alkyd resins, lubricants, paper sizing agent, and its derivatives show pronounced biological activity [1−5]. This review article mainly covers the literature data on preparation of new maleo- and citraconopimaric acid derivatives since 2000 year as well as work carried out in the Institute of Chemistry of New Materials NAS of Belarus.

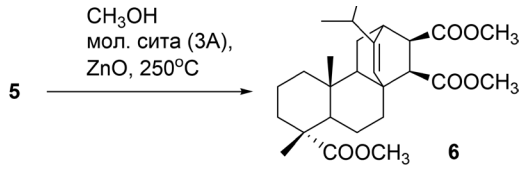
1. The synthesis and application of maleopimaric acid and its derivatives. The MPA, **5** was firstly obtained independently by Arbuzov and Ruzicka et al. in 1932 in the course of studies of resin acids structure [6, 7]. Two main groups of methods have been proposed for the MPA synthesis. The first group consists of methods using reaction of levopimaric acid **4** (content up to 53% in wood resin [8]) and maleic anhydride at 30–80 ºC [9, 10]. The disadvantage of these methods is that abietic-type acids (abietic **1,** neoabietic **2**, palustric **3**) except levopimaric acid **4** stay intact decreasing MPA yield.

The second group of methods is based on reaction of abietic-type acids (abietic **1,** neoabietic **2**, palustric **3**) of rosin with maleic anhydride at 90–200 ºC or MW-irradiation including the application of catalysts followed by isolation of MPA from mixture [11–13]. These methods are the most often used for individual MPA synthesis.

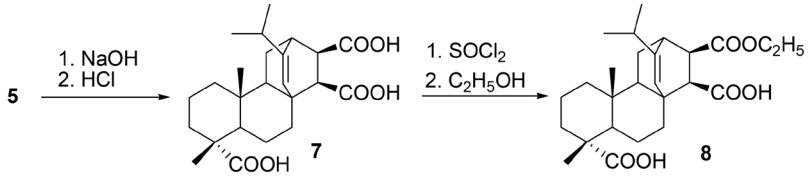
© Bei M. P., Yuvchenko A. P. , Sokol O. V., 2017



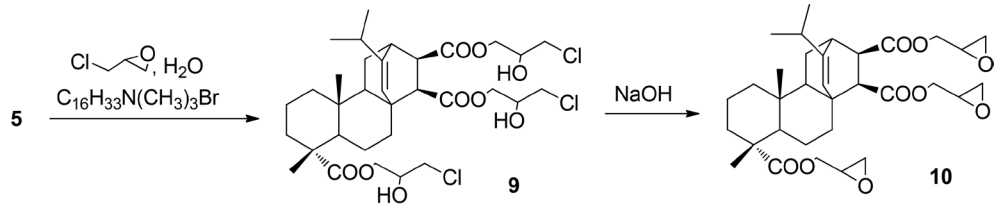
MPA is a tribasic acid anhydride, as a result its derivatives on carboxyl groups, in particular mono-, di-, tri- and polyesters are among the most important. MPA methyl ester was firstly obtained by treatment of MPA with diazomethane [14] and monoethyl-, propyl- and butyl esters were prepared by reaction of MPA with PCl_3 followed by treatment with the correspondent alcohol [15]. The MPA vinyl ester was synthesized by reaction of MPA and vinyl acetate catalyzed by mercury salt [16]. MPA trimethylester **6** was prepared by reaction of MPA and methyl alcohol in autoclave at the presence of molecular sieves (3Å) at 250 ºC for 4 h in 98% yield [17].



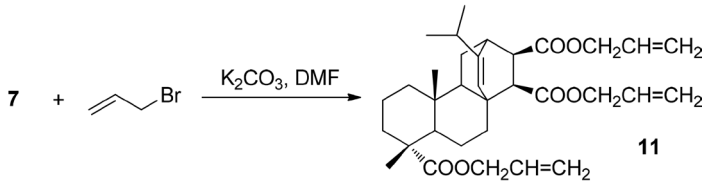
The treatment of MPA with 30% NaOH solution and subsequent acidification gave triacid **7**. Reaction of the acid **7** with $SOCl_2$ followed by the treatment with ethyl alcohol led to the regioselective formation of monoethyl ester **8** in 73% yield [18].



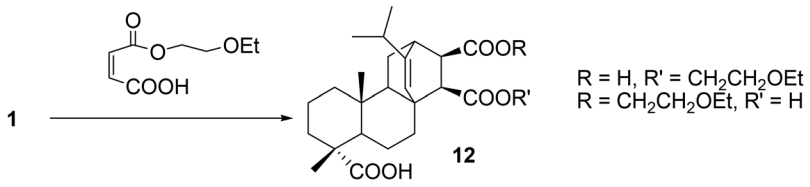
The MPA triglycidyl ester useful for polymer producing was prepared in two stages. Firstly the reaction of MPA with epichlorohydrin in the presence of hexadecyltrimethylammonium bromide gave triol **9**, which was converted into triglycidyl ester **10** in 87% yield under the treatment with sodium hydroxide solution [19].



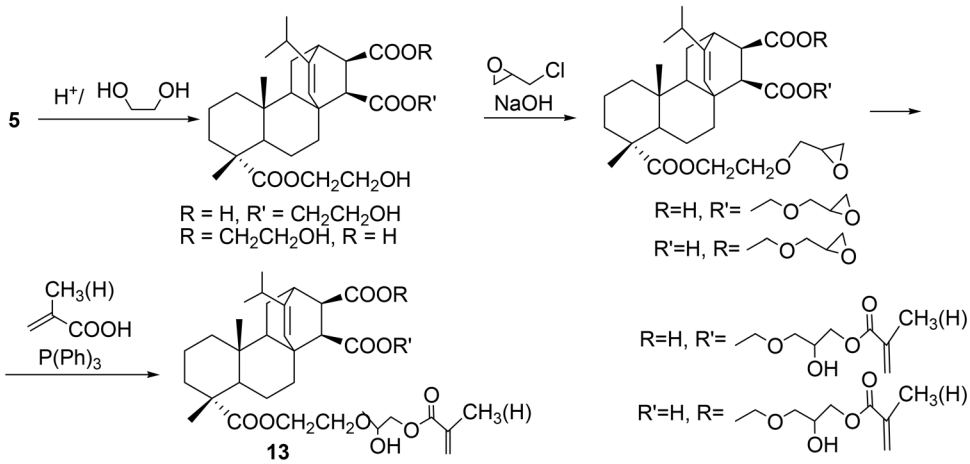
MPA triallyl ester **11** was synthesized by reaction of triacid **7** with allyl bromide in 91% yield and used for preparation of bio-based thermosetting resins [20].



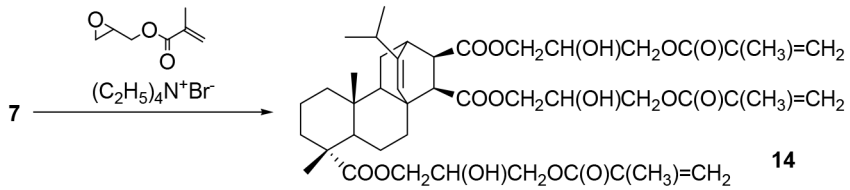
The mixture containing the isomeric MPA 2-ethoxyethyl esters **12** was prepared by reaction of tall rosin with 2-ethoxyethylmaleat and used as paper sizing agent [21].



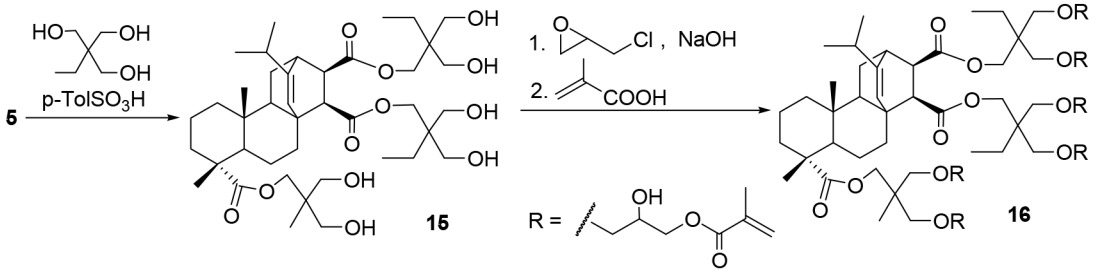
MPA was used for the synthesis of acrylic esters. The esterification of MPA with ethylene glycol gave a mixture of diesters that on treatment with epichlorohydrin followed by reaction with acrylic or methacrylic acids in the presence of $P(Ph)_3$ provided the mixture of acrylic esters **13** useful for corrosion protection of metals [22].



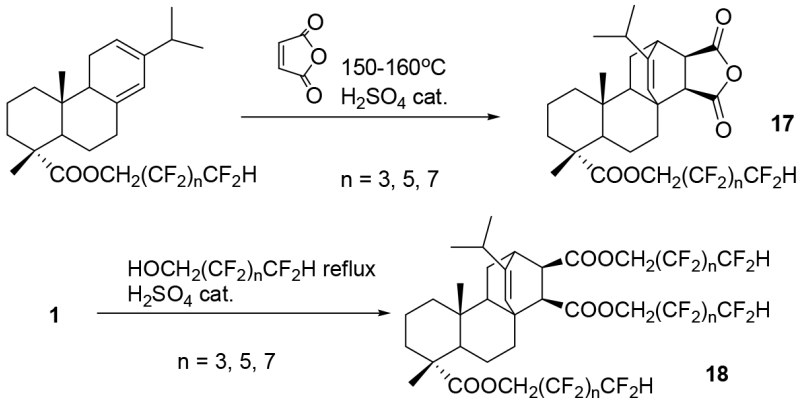
The MPA triacrylic ester **14** was prepared in two stages. MPA was converted into triacid **7**, and subsequent treatment of the latter one with glycidyl methacrylate in the presence of tetraethylammonium bromide gave triester **14** useful for producing of methyl methacrylate and stirol copolymers [23].



RMA was esterified by trimethylol propane to give mixture containing polyol **15**. Reaction of polyol **15** successively with epichlorohydrin and methacrylic acid afforded polyacrilic ester **16**. Thermal, mechanical and chemical performance of vinyl ester resins based on ester **16** as high performance coatings materials were found to be comparable to those of conventional petroleum based coating materials [24].

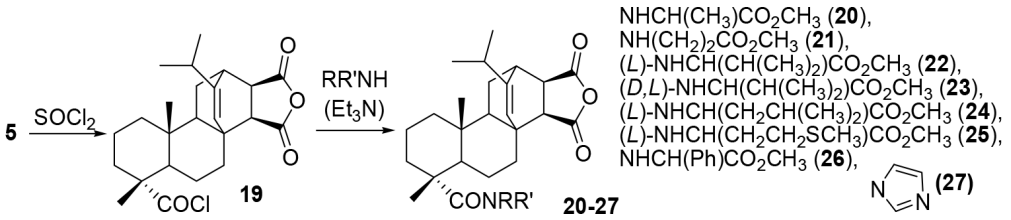


The perfluoroalkyl esters of MPA **17** were prepared by Diels-Alder reaction of rosin perflouroalkyl esters with maleic anhydride at 150–160 ºC under acidic catalysis [25]. The refluxing of MPA in the corresponding alcohol at the presence of sulfuric acid gave MPA perfluoroalkyl triesters **18** in 55–70% yield [26].

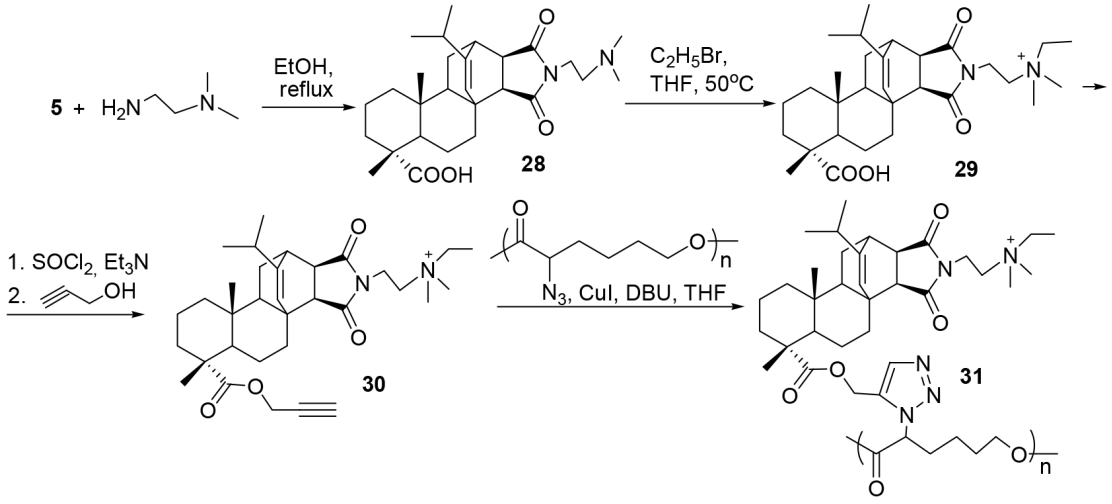


Amide compounds from MPA were firstly synthesized by treatment of MPA vinyl ester with cyclohexylamine [16]. It was found substituted MPA amides show pronounced hepatoprotective [27], antimicrobial [5] and fungicidal properties [28], and MPA based polyamides are suitable for applications as protective films, printing inks, thermo stable polymers [29–31].

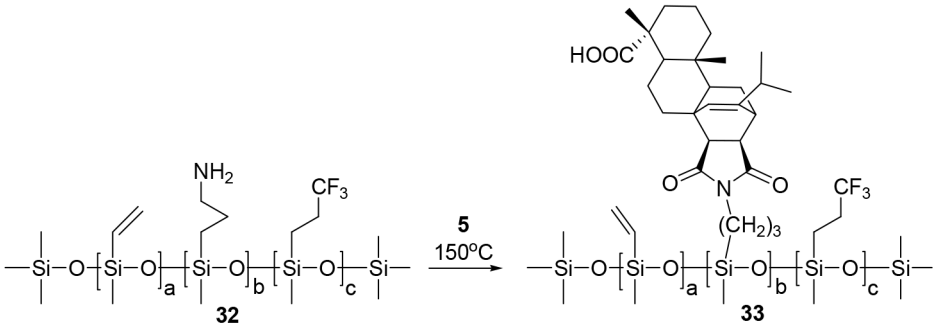
MPA amides **20**–**27** with anti-inflammatory and antiulcer properties were synthesized by reaction of MPA chloride **19** with amino acids and imidazole. It was established that amide **24** prepared from L-leucine has the highest anti-inflammatory properties and show low toxicity [32].



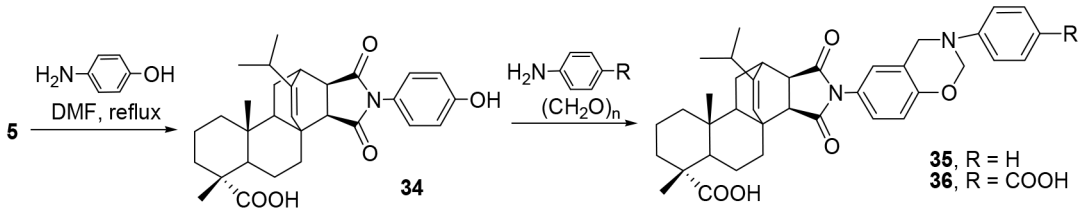
Wang et al. synthesized antimicrobial polymers **31** based on MPA N-(2-N,N-dimethylethyl)imide and azide substituted poly(ε-caprolactone). MPA N-(2-N,N-dimethylethyl)imide after quaternization and esterification with propargyl alcohol was grafted on polymer by click-reaction with the use of CuI/DBU as catalysts [33].



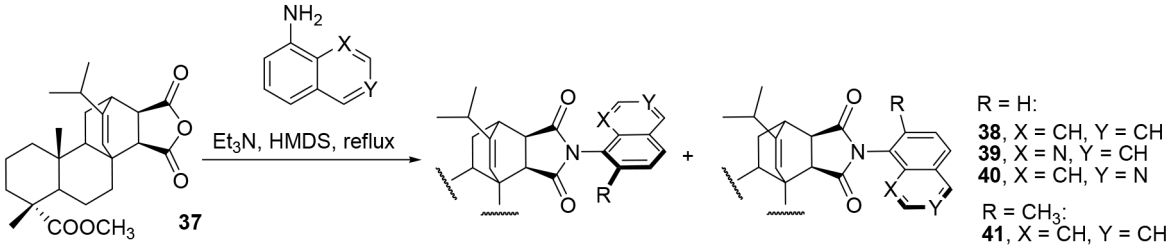
The MPA imide modified fluorosilicone resin **33** was prepared by heating of MPA and amine containing fluorosilicone resin **32** at 150°C for 4 h. This novel crosslinker was added into high temperature vulcanization rubber composition to prepare a series of MPA modified fluorosilicone rubbers with increased mechanical properties [34, 35].



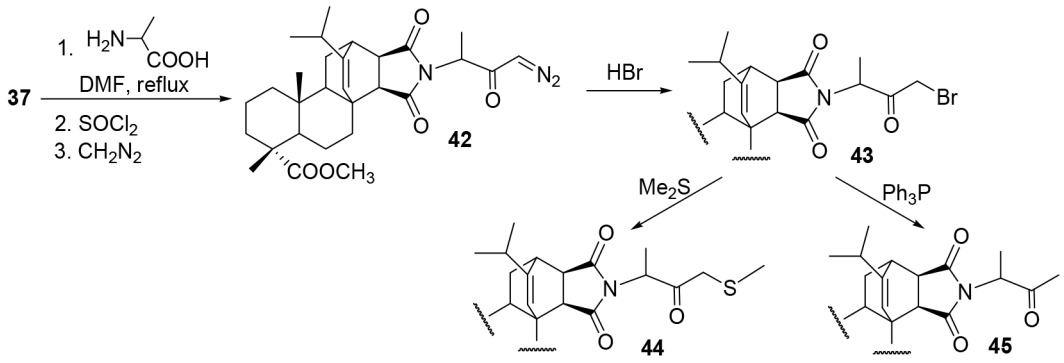
The benzoxazine monomers **35, 36** were synthesized from MPA in two steps. The reaction of MPA and 4-aminophenol afforded MPA N-(4-hydroxy)phenyl imide **34** that on reaction with paraformaldehyde and aniline (or 4-aminobenzoic acid) gave benzoxazines **35, 36.** The polybenzoxazines were prepared by polymerization of compound **35, 36** and showed high thermal stability [36].



Reactions of MPA methyl ester **37** with 1-naphtylamine, 8-aminoquinoline, 5-aminoisoquinoline [37] and 2-methy-1-naphtylamine [38] in refluxing triethylamine in the presence of hexamethyldisilazane (HMDS) give MPA imides **38–41** as the mixture of atropisomers. It was found N-(2-methylnaphtyl-1) imide of MPA methyl ester **41** has anti-proliferative properties and a significant difference in the level of cytotoxicity was observed between R- and S-conformers [38].

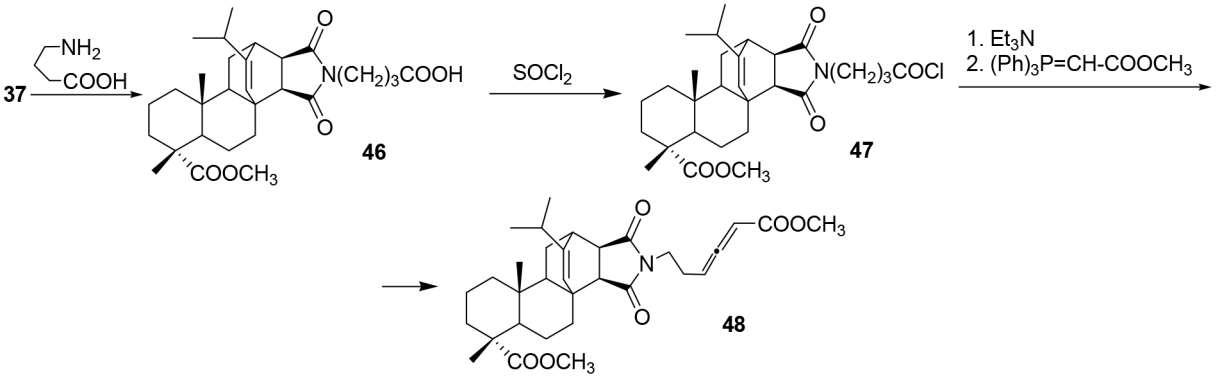


The bromomethylketone **43** was synthesized for the first time under Arndt–Eistert reaction conditions via condensation of ester **37** and alanine. Treatment of ketone **43** with Me_2S or Ph_3P led to the formation of methylsulfide **44** or to reduction into ketone **45**, presumably due to the traces of water [39].

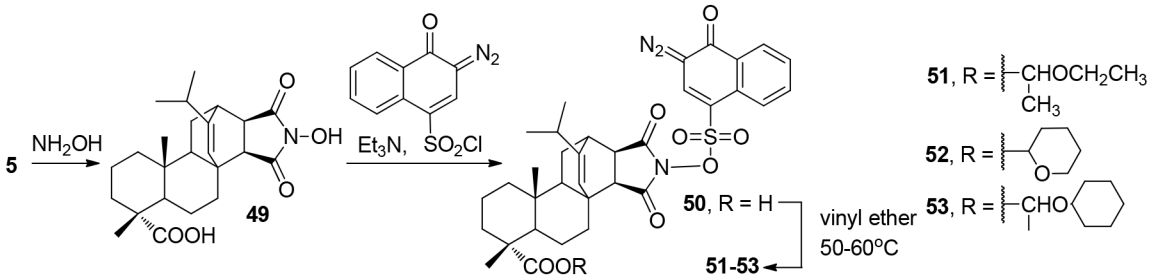


The allene **48** was synthesized from methyl maleopimarate **37** and γ-aminobutyric acid (GABA). Direct fusion or condensation of ester **37** with GABA gave the imide **46** in 52 or 72% yields, respectively, which was converted into the corresponding acid chloride **47** by reaction with $SOCl_2$ excess.

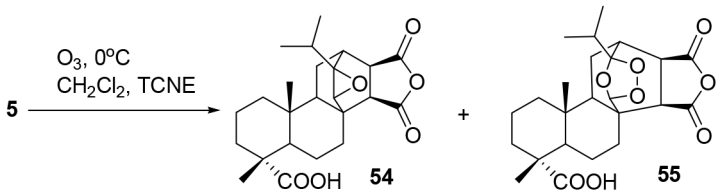
Treatment of chloride with Et_3N and subsequent reaction with methyl(triphenylphosphoranylidene)acetate provided the corresponding allenoate **48** in 66% yield [40].



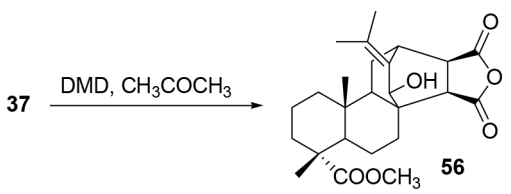
New molecular glass compounds containing 2-diazo-1-naphthoquinone-4-sulfonyl group were designed based on MPA. Reaction of MPA with hydroxylamine gave MPA N-hydroxyimide **49** in 70% yield that on esterification with 2-diazo-1-naphthoquinone-4-sulfonyl chloride provided N-hydroxy maleopimarimide sulfonate **50**. The carboxylic acid group of the acid **50** was then protected by the reaction with vinyl ether compounds (vinylethyl ether, cyclohexylvinyl ether, dihydropiran) to give the corresponding esters **51–53**. The novel one-component molecular glass resists **51–53** have potential to become high-performance i-line photoresists [41].



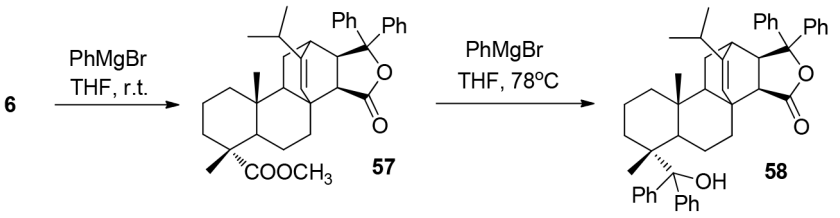
Hess et al. showed that the ozonolysis of MPA in the presence of tetracyanoethylene (TCNE) and subsequent purification lead to isolation of known epoxide **54** in 20% yield and the ozonide **55** in 7% yield [42].



Reaction of the MPA methyl ester **37** and dimethyldioxirane (DMD) resulted in regioselective oxidation of the bridging double bond to form the alcohol **56** [43].

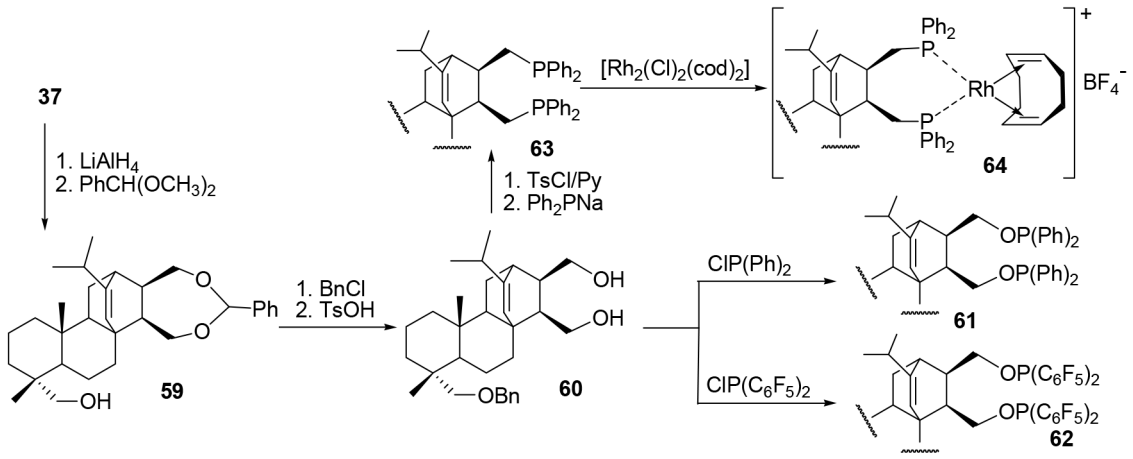


Yao et al. established that reaction of MPA trimethyl ester **6** with PhMgBr proceeds at only one carboxyl group at r. t. to form lactone **57** that on treatment with Grignard reagent at 78°C converts into alcohol **58** [44].

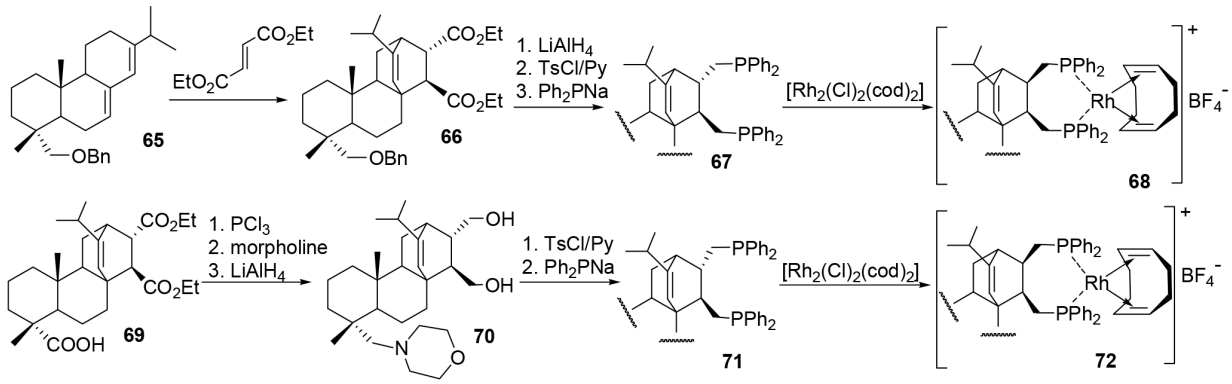


Asymmetric synthesis has been one of the most important topics in organic chemistry over the past decades and terpenoid substances prepared from rosin are very accessible optical pure compounds that make them useful starting synthone for synthesis of chiral ligands.

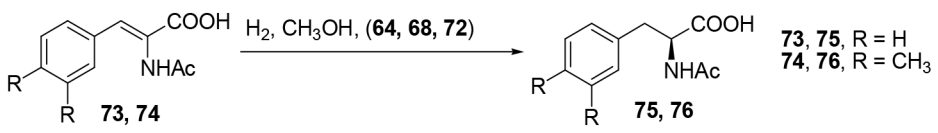
Chiral bisphosphinic ligand **63, 67, 71** were synthesized from MPA [45]. Reduction of MPA methyl ester **37** with $LiAlH_4$ and protection of 1,4-diol moiety gave benzylidenedihydroxy derivative **59**. Formation of benzylic ether and deprotection led to the diol **60** that was treated with phosphine chlorides to give 1,4-bisphosphineoxides **61, 62**. Treatment of diol with *p*-toluenesulfochloride gave ditosylate that on reaction with sodium diphenylphosphide afforded bisphosphine **63**. Reaction of bisphosphine with di-**μ**-chloro-bis-(1,5-cyclodiene)dirhodium and $NaBF_4$ in CH_2Cl_2 yields the cation Rh(I)-complexes **64**.



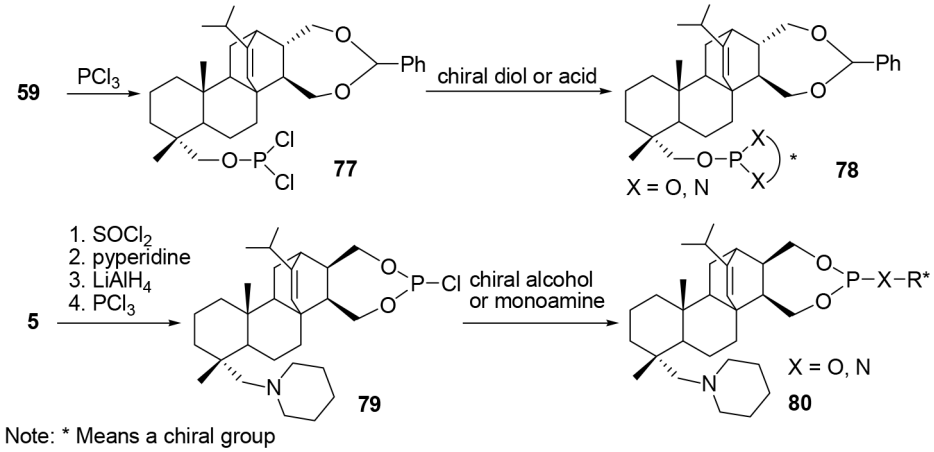
The ligands **67, 71** and their Rh(I)-complexes **68, 72** were prepared from benzylic ether of abiethynol **66** and diethyl fumaropimarate **69** in a similar manner [45].



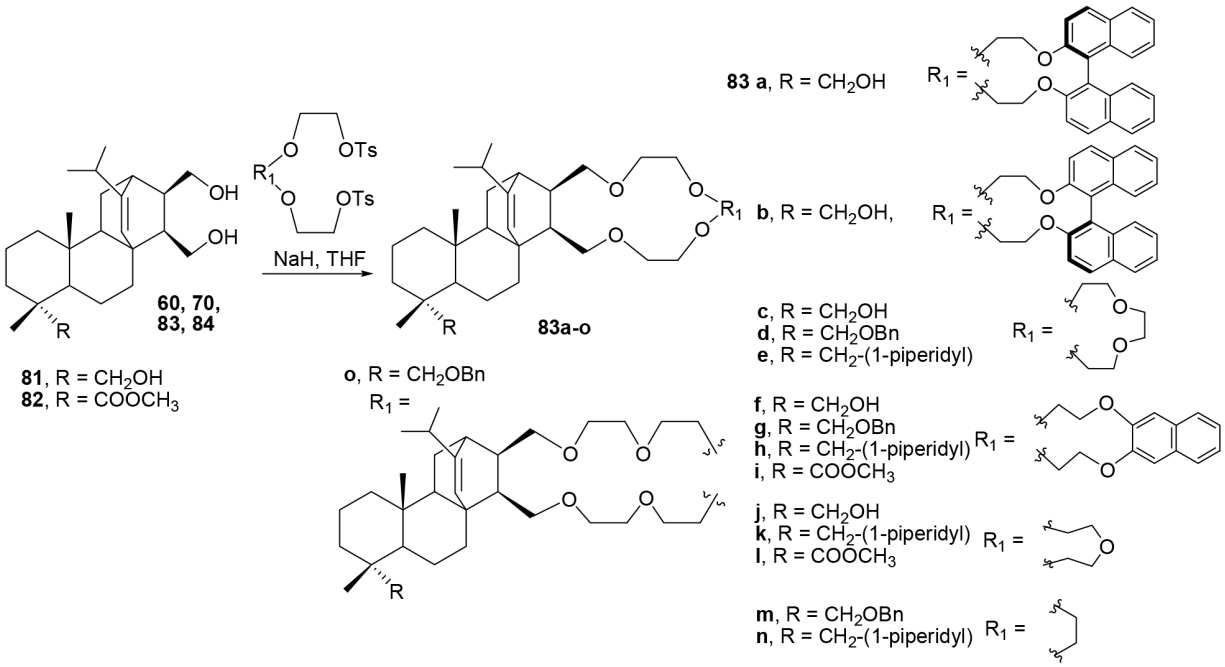
The rhodium complexes **64, 68, 72** were used as catalysts for hydrogenation of substituted cinnamic acids **73, 74**. It was found application of these catalysts provided hydrogenation to give amino acids **75, 76** with up to 100% yield and 66% *ee* [45].



Two chiral phosphorus derivatizing agents **77** and **79** were synthesized from MPA and it was established these derivatives are well suited for the ^{31}P NMR-based determination of enantiomeric excess of chiral alcohols and amines in solutions [46].



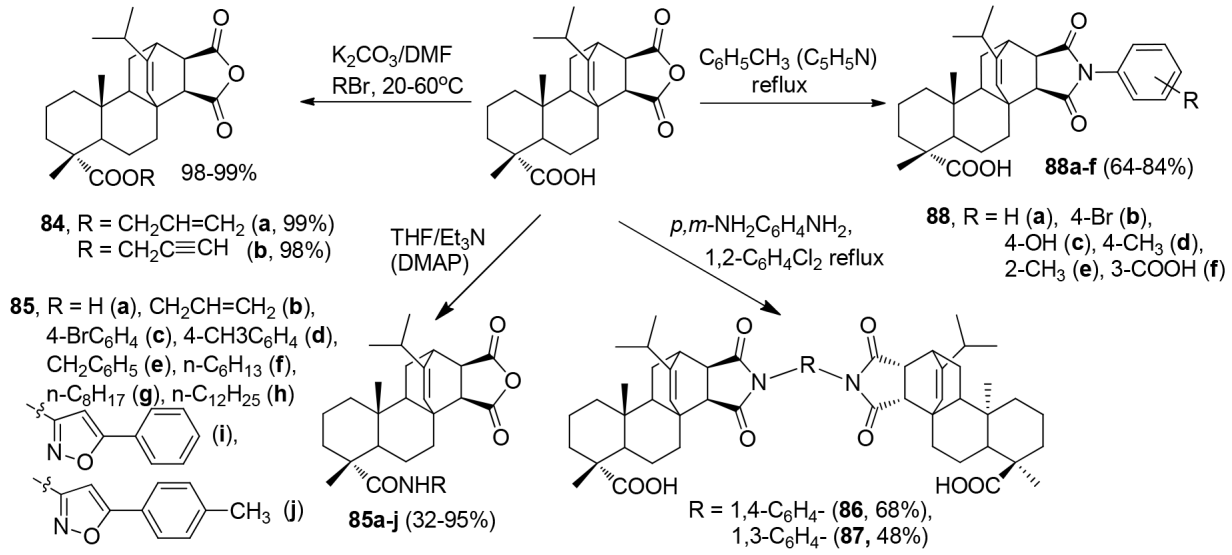
A series of chiral crown ethers **83a–o** including 28-crown-8, 22-crown-6, 20-crown-6, 17-crown-5 and 14-crown-3 bearing hydroxyl side group derivatives comprising of binaphthyl, naphthalene and rosin acid moieties in the crown ring was prepared based on MPA [47, 48].



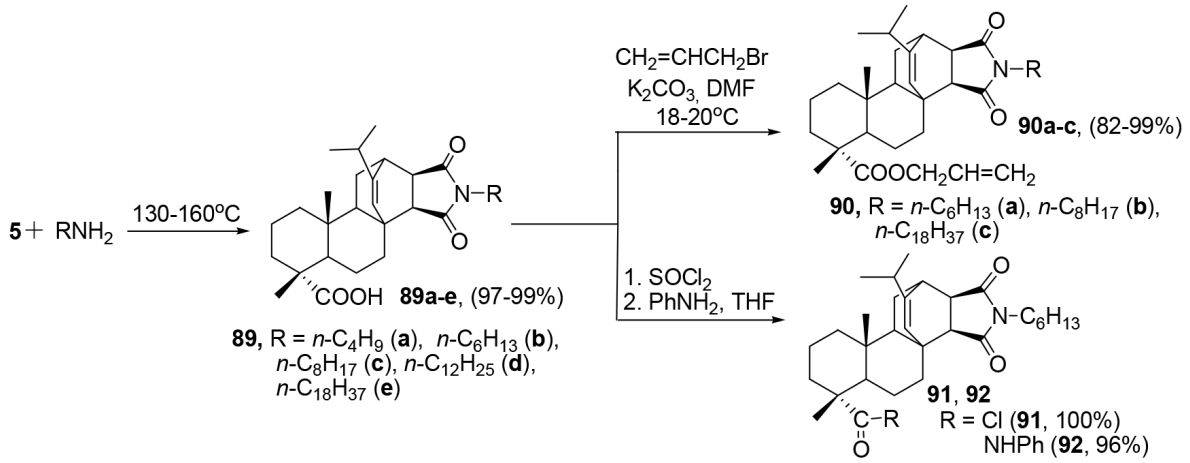
These receptors **83a–o** showed strong affinity and different complementarity for various amine salts, and exhibited excellent enantiodiscriminating abilities towards protonated primary amines and amino acid methyl ester salt isomers in chiral recognition [48].

To conclude this section it is worth noting that apart from individual MPA derivatives the esters of RMA with polyols (ethylene glycol, glycerol, pentaerythritol etc.) as well as RMA imides are widely used in industry for production of alkyd and epoxy resins, printing inks, polymers and copolymers, sizing agents for paper making [3, 4].

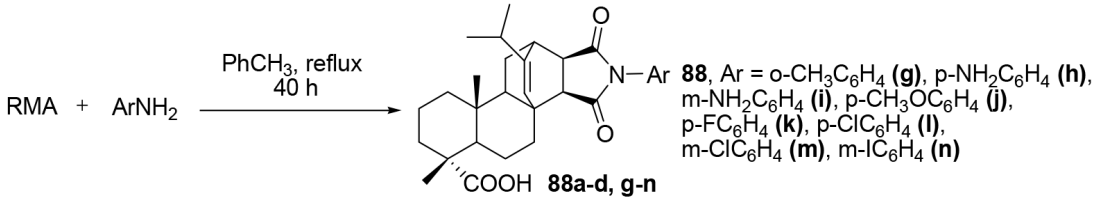
2. Researches on diterpenoids at The Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus. The new preparative methods for synthesis of MPA unsaturated esters **84a, b**, amides **85a–j**, imides **88a–f** and diimido diacids **86, 87** were developed by reaction of MPA with allyl-, propargyl bromide, aliphatic and aromatic amines [49–52].



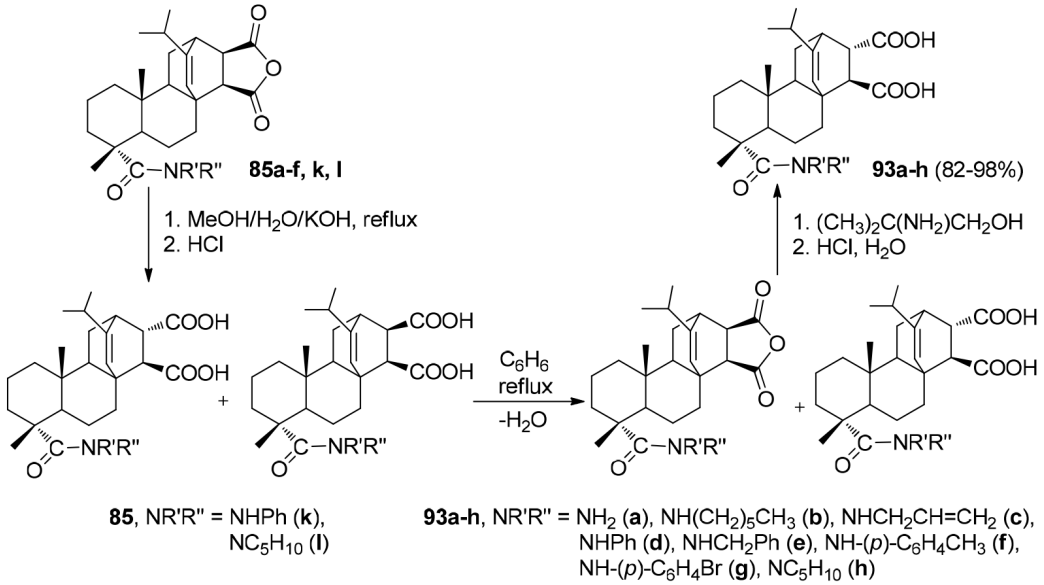
The synthesis of previously unknown MPA N-alkylimides **89a–e**, including long-chain dodecyl- and octadecylimides **89d, e** by reaction of primary aliphatic amines with MPA in the melt was developed. The method eliminates the use of organic solvents, allows application as a starting compound MPA and acetic acid solvate, significantly reduces reaction time [53]. Imido amide **92** was prepared by reaction of imide **89b** with thionyl chloride followed by reaction with aniline.



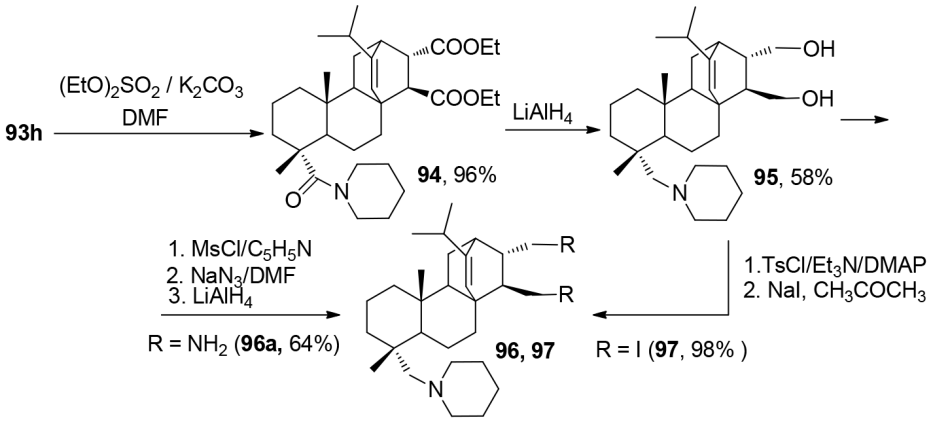
The MPA N-arylimides synthesis directly from RMA without isolation of individual MPA was developed based on treatment of RMA with primary aromatic amines in toluene (refluxing) to form exclusively N-arylimides **88a–e**, **g–n** in preparative yields (60–99% based on MPA contained in the RMA) [51].



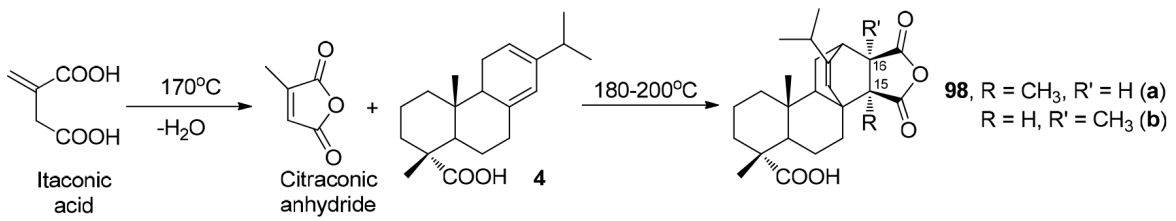
We elaborated the method of fumaropimaric acid monoamides **93a–h** synthesis containing *trans*-1,2-dicarboxylic fragment by alkali hydrolysis of anhydride group in MPA amides **85a–f, k, l** and subsequent isomerization of *cis*-1,2-dicarboxylic acid. The monoamides **93a–h** were isolated from the reaction mixture by conversion into water-soluble ammonium salts [54].



Esterification and subsequent reduction of amide **93h** afforded diol **95** that was converted into diamine **96** and diiodide **97** by conventional methods.

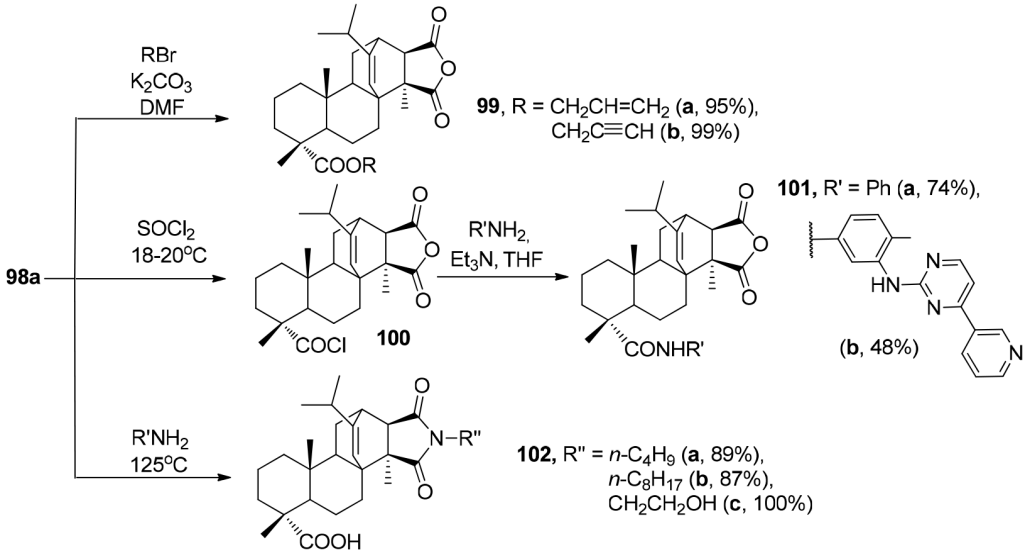


With a goal of citraconopimaric acid (CPA) synthesis the reaction of citraconic anhydride, formed *in situ* from readily available itaconic acid (produced industrially by the fermentation of carbohydrates) on heating above the melting point (172 ºC), and rosin has been studied. It was established that the heating of mixture of rosin and itaconic acid at 180−200 ºC for 8–12 h leads to the reaction of citraconic anhydride with levopimaric acid and to the formation of complex mixture containing isomeric citraconopimaric acids **98a, b** and unreacted resin acids (IR, ^{1}H NMR data). IR-spectra of the mixture contain characteristic bands of anhydride cycle at 1850, 1785 cm^{-1}. The crystallization of the reaction product from CCl_4 at 18–20 ºC gives precipitate of solvate CPA with CCl_4, and its thermal decomposition at 130 ºC gives CPA as a mixture of two isomers **98a, b** at ratio ~1:0.36. CPA isomers differ in the arrangement of the methyl group in the anhydride cycle only and have almost the same chromatographic mobility in different systems. By partial crystallization of mixture of isomers **98a** and **98b** from benzene the isomer **98a** was separated in 36% yield (based on mixture of isomers **98a, b**) [55].



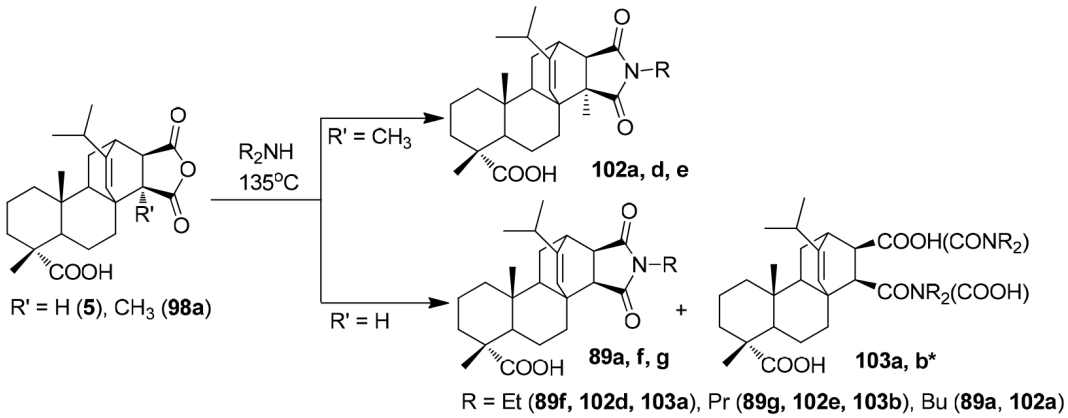
The full assignments of peaks in ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were performed by two-dimensional NMR spectroscopy, and it was confirmed that the compound **98a** is the adduct of citraconic anhydride and levopimaric acid (citraconopimaric acid) and a close structural analog of MPA, containing methyl in the α-position of the anhydride group [56].

Reaction of CPA **98a** with allyl- or propargylbromide in the presence of K_2CO_3 afforded unsaturated esters **99a, b** [49]. The treatment of CPA **98a** with thionyl chloride gave the acid chloride **100**, and its reaction with aniline and N-(2-methyl-5-aminophenyl)-4-(pyrid-3-yl)pyrimidine-2-amine led to the formation of anilide **101a** and heterocyclic amide **101b** [57].



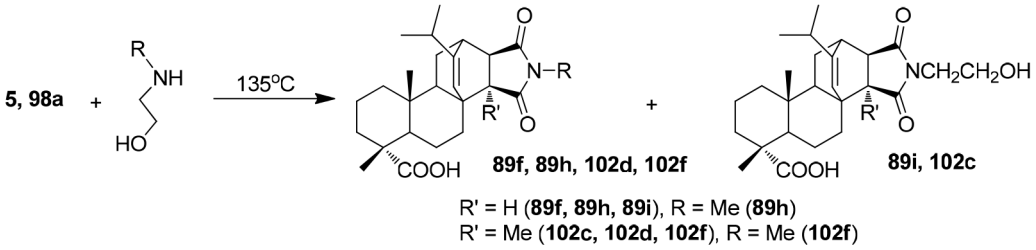
The N-alkylimides **102a–c** were synthesized by reaction of CPA with secondary *n*-butylamine, *n*-octylamine, ethanolamine at 125°C [58]. The treatment of CPA N-(2-hydroxyethyl)imide **102c** with dimethylsulfate in the presence of K_2CO_3 gave methyl ester of CPA N-(2-hydroxyethyl)imide (yield 73%).

Reactions of CPA and MPA with secondary aliphatic amines (diethyl-. dipropyl-, dibutylamine) were investigated for the first time [59]. Formation of CPA N-substituted imides instead of expected amido acids was found. In contrast to CPA reaction of MPA gives the only product in reaction with dibutylamine, but in reactions with diethyl- and dipropylamines amido acids **103a, b** were formed together with MPA N-ethyl(propyl)imide.

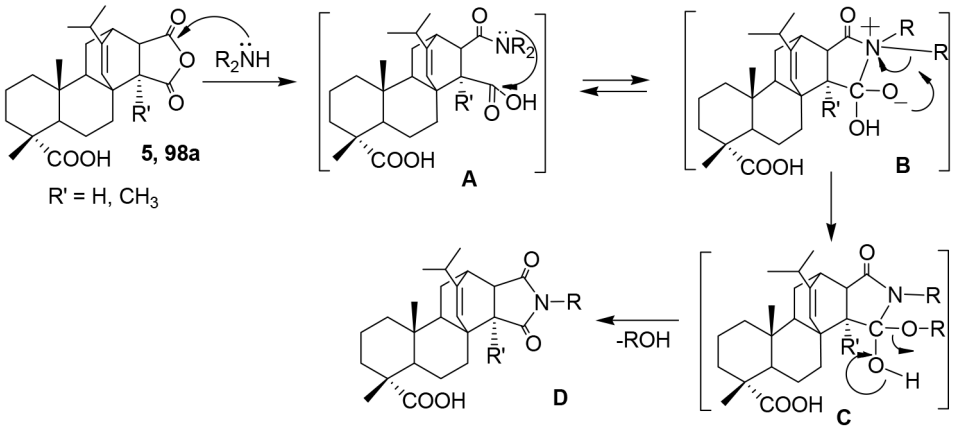


* Exact location of the amide group in compounds **103 a, b** is not defined.

The treatment of MPA and CPA with unsymmetrical methyl(ethyl)-2-hydroxyethylamines leads to formation of two imides: N-methyl(ethyl)- and N-(2-hydroxyethyl)imides of MPA and CPA (in molar ratio 1:(0.78−1.63)) [59].



The mechanism of this reaction presumably involves the formation of the intermediate amic acid **(A)** that undergoes intramolecular cyclization to form the cyclic intermediate **(B)**, which is stabilized by the migration of the alkyl group **(C)**, followed by elimination of alcohol and formation of the cyclic N-alkylimid **(D)**. In the case of the reaction MPA, CPA with unsymmetrical secondary amines the formation of two imides, presumably, the result of migration of various alkyl groups in the intermediate **(B)**. The mechanism of this reaction is likely close to the mechanism of N-substituted imides formation in reaction of cyclic anhydrides with primary amines.



Ways of practical use of MPA and CPA derivatives. The effect of the MPA allyl ester **84a** was studied on rheological properties in modifying of low density polyethylene (LDPE) with itaconic acid in the presence of free radical initiators. It was found that ester **84a** additive in an amount of 1 wt. % of the reaction system decreases the efficiency of grafting only in 13% with more than 2 times the viscosity of the grafted product is reduced. The MPA ester **84a** may be used as a viscosity regulator during reactive extrusion of functionalized polyethylene with the desired rheological performance as well as in the preparation of coextruded multilayer polymeric products. Adhesive was developed based on ethylene-vinyl acetate copolymer (CEVA) with the addition of the MPA allyl ester **84a**, including CEVA, fumaric acid, an organic peroxide, a stabilizer and 0.01–1.0% of allyl ester **84a**. Adhesive bond strength with polar substrate of polyamide-6 for developed adhesive reaches 4.9 kN/m, which is 91% higher than that for similar adhesive compounds [60].

The MPA N-hexylimide **89b** is the effective adhesive additive to LDPE in the preparation of composite materials to wood at a concentration of 3%. The application of imide **89b** retains strength, highly elastic and rheological properties of the polymer composition, simultaneously the adhesive strength of the LDPE to the wood increases to 3.6 MPa, which is 1.6–1.8 times greater in comparison with samples of pure LDPE [61].

It was found that the nitrogen-containing MPA derivatives (aromatic amides **85a–c, f,** imide **89e** etc.) have twisting power and can be used as effective additives to nematic LC-materials [62].

A fungicidal composition comprising a salt of MPA N-hexylimide and 8-hydroxyquinoline was designed to protect the cellulose-containing materials [63].

Films of the compounds **5, 84a, b, 98a, 99a, b** prepared by thermal vacuum deposition method (TVD) are sensitive to UV radiation (3.6–7.1 J/cm^2) and of practical interest for the production of photomasks for wet etching topology in transparent conductive layers of indium tin oxide (ITO) [49].

To conclude this short review, since the last decades there has been a trend towards the development of methods for the use of renewable raw materials instead of fossil in the manufacture of industrial products. As it is evident from the review, it is possible to obtain a great number of based on rosin substances with diverse structures and properties for various applications, and these works constitute important part of the green chemistry development.

References

1. Galin F. Z., Flehter O. B., Tret'iakova E.., "Synthesis and reactions of diene adducts of resin acids", *Himiia i komp'iuternoe modelirovanie. Butlerovskie soobshcheniia* [Chemistry and computer simulation. Butlerov communications], 2004, no. 2, pp. 1–21.

2. Wiyono B., Tachibana S., Tinambunan D., "Characteristics and chemical composition of maleopimaric and fumaropimaric rosins made of indonesian Pinus merkusii rosin", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, vol. 10, no. 18, pp. 3057–3064.

3. Yoshi K., Ken H., Kyosuke B., Masahiko S., Arakawa Chem Ind., *Rosin emulsion sizing agent and paper*, CN, Pat. № 105386366, 2016.

4. Zhang J., *Rosin-based Chemicals and Polymer*, Smithers Rapra Technology, Akron, USA, 2012.

5. Svikle D. Ya., Prikule A. Ya., Shuster Ya. Ya., Veselov I. A., "Biological Activity and Toxicity of Maleopimaric Acid Derivatives", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1978, vol. 12, no. 5, pp. 617–620.

6. Arbuzov B. A., "About the presence of conjugated double bounds in abietic acid", *Zhurnal obshchei khimii* [Journal of General Chemistry], 1932, vol. 2, no. 2, pp. 806–809.

7. Ruzicka L., Ankersmit P. J., Frank B., "Polyterpene und Polyterpenoide LXXIII. Anlagerung von Maleinsäureanhydrid an Abietinsäure und Dextropimarsäure", *Helvetica Chimica Acta*, 1932, vol. 15, no. 1, pp. 1289–1294.

8. Komschilov N. F., *Kanifol', ee sostav i stroenie smolianykh kislot* [Rosin, its composition and structures of resin acids], Lesnaia promyshlennost', Moscow, RU, 1965.

9. Sokolov A. G., *Sposob kompleksnoi pererabotki sosnovoi zhivitsy* [The way to complex treatment of pine resin], Komitet po delam izobretenii i otkrytii pri Sovete Ministrov SSSR, USSR, Pat. 113132, 1958.

10. Lloyd W. D., Hedrick G. W., "The Diels-Alder reaction of levopimaric acid and its use in quantitative determination", *Journal of Organic Chemistry*, 1961, vol. 26, no. 6, pp. 2029–2032.

11. Aldrich P. H., *Process for separation of rosin adducts from mixtures with rosin*, US, Pat. № 3562243, 1971.

12. Gonis G., Slezak F. B., Lawson N. E., "Preparation of maleopimaric acid", *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*, 1973, vol. 12, no. 4, pp. 326–327.

13. Wang, H. X., Shang, S. B., Li, J. F., "Synthesis of maleopimaric acid under microwave irradiation", *Chemical reagent*, 2009, vol. 33, no. 3, pp. 177−179.

14. Ruzieka L., LaLande W. A., "Zur Kenntnis der Diterpene. (44. Mitteilung). Uber die Einwirkung von Ozon und Permanganat auf das Anlagerungsprodukt von Maleinsäure-anhydrid an Lävopimarsäure", *Helvetica Chimica Acta*, 1940, vol. 23, no. 1, pp. 1357–1366.

15. Graaf, M., "Synthesis of the monoacid chloride and the monoalkyl esters of the maleic acid anhydride addition product of l-pimaric acid", *Journal of the American Chemical Society*, 1946, vol. 68, no. 10, pp. 1937–1938.

16. Lewis J. B., Lloyd W. D., Hedrick G. W., "Preparation and some reactions of the vinyl ester of maleopimaric acid", *Journal of Organic Chemistry*, 1960, vol. 25, no. 7, pp. 1206–1208.

17. Huang K., Tang X., Xia J., "Synthesis of trimethyl maleopimaric acid assisted by molecular sieve", *Biomass Chemical Engineering*, 2012, vol. 46, no. 1, pp. 11–14.

18. Hong G., Song Z., Shang S., Xu X., Wang X., "Synthesis, crystal structure and application of maleopimaric acid mono-ethyl ester", *Asian Journal of Chemistry*, 2010, vol. 22, no. 6, pp. 4681−4687.

19. Minmin S., Chengyong H., Zhimeng L., Dongguan Science and Engeeniring, *Glycide maleopimarate and its preparing process*, CN, Pat. № 1297011A PRC, 2001.

20. Qiangqiang Ma, Xiaoqing Liu, Ruoyu Zhang, Jin Zhu, Yanhua Jiang, "Synthesis and properties of full bio-based thermosetting resins from rosin acid and soybean oil: the role of rosin acid derivatives", *Green Chemistry*, 2015, vol. 15, no. 5, pp. 1300–1310.

21. Chernaia N. V., Chubis P. A., "Features of the filler in the sized fiber suspension", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2008, no. 3, pp. 111–115.

22. Ayman M. Atta, Shymaa M. El-Saeed, Reem K. Farag, "New vinyl ester resins based on rosin for coating application", *Reactive and Functional Polymers*, 2006, vol. 66, no. 12, pp. 1596–1608.

23. Matynia T., Podgorski M., "Synteza i ocena wlasciwosci multimetakrylanow pochodnych kwasu maleopimarowego", *Przemysl Chemiczny*, 2005, vol. 84, no. 12, pp. 927−932.

24. Jaswal S., Bharti G., "Structure-Property Correlation Study of Bio-Based Multifunctional Vinyl Ester Resin in Presence Of Methacrylated Lignin Model Compounds", *Polymer Science Series B*, 2015, vol. 57, no. 5, pp. 417–433.

25. Popova L. M., Dmitrieva Yu. A., Vershilov S. V., "Preparation of Maleopimar Adducts of Polyfluoroalkyl Esters of Tall Colophony", *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2011, vol. 84, no. 5, pp. 895−897.

26. Popova L. M., Vershilov S. V., Dmitrieva Yu. A., "The esterification of maleopimaric adduct with α,α,ω-trihydroperfluoroalkanols", *Khimiia rastitel'nogo syr'ia* [Chemistry of plant raw materials], 2014, no. 1, pp. 73–76.

27. Delevalee F., Deraedt R., Benzoni J., Roussel-UCLAF, *Method of inducing immunostimulating activity*, US, Pat. № 4880803, 1989.

28. Svikle D. Ia, Kalnin'sh A. Ia, Karklin' R. Ia, Pruse B. A, Prikule A. Ia, Rumba A. A, Rasinia R. A, Shvinska D. F, Baumane G. K, Kul'kevits A. Ia., Institut khimii drevesiny AN LatvSSR, *Soli ili efiry N-zameshchennykh imidov maleopimarovoi kisloty, proiavliaiushchie fungitsidnuiu aktivnost', i sposob ikh poluchenia* [Salts and esters of N-substituted maleopimaric acid imides with fungicide activity and its preparation], Baza patentov SSSR, USSR, Pat. 584722, 1994.

29. Schuller W. H., Lawrence R. W., Culbertson B. M., "Some polyimide-amides from maleopimaric acid", *Journal of Polymer Science*, 1967, vol. 5, no. 8, pp. 2204–2207.

30. Penczek P., "Kwasy N-hydroksyalkilomaleimidopimarowe, N- hydroksyalkilomaleimidopimaric", *Roczniki Chemii*, 1970, vol. 44, no. 10, pp. 1815–1819.

31. Ray S. S., Kundu A. K., Ghosh M., Maiti S., "A new route to synthesize polyamideimide from rosin", *European Polymer Journal*, 1985, vol. 21, no. 2, pp. 131–133.

32. Kazakova O. B., Tret'yakova E. V., Kukovinets O. S., Tolstikov G. A., Nazyrov T. I., Chudov I. V., Ismagilova A. F., "Synthesis and pharmacological activity of amides and the ozonolysis product of maleopimaric acid", *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2010, vol. 36, no. 6, pp. 832−840.

33. Jifu Wang, Yung Pin Chen, Kejian Yao, Perry A. Wilbon, Wujie Zhang, Lixia Ren, Juhua Zhou, Mitzi Nagarkatti, Chunpeng Wang, Fuxiang Chu, Xiaoming He, Alan W. Decho, Chuanbing Tang, "Robust antimicrobial compounds and polymers derived from natural resin acids", *Chemical Communications*, 2012, vol. 48, pp. 916−918.

34. Tao Xu, He Liu, Jie Song, Shibin Shang, Zhanqian Song, Kaifei Zou, Chong Yang, "Synthesis and characterization of novel fluorosilicone rubber using imide modified vinyl-containing fluorosilicone resin as cross-linker", *Journal of Polymer Science Part A Polymer Chemistry*, 2015, vol. 53, no. 15, pp. 1769–1776.

35. Tao Xu, He Liu, Jie Song, Shi-Bin Shang, Zhan-Qian Song, Xiu-Jie Chen Chong Yang, "Synthesis and characterization of imide modified poly(dimethylsiloxane) with maleopimaric acid as raw material", *Chinese Chemical Letters*, 2015, vol. 26, no. 5, pp. 572–574.

36. Shengfang Li, Tao Zou, Xianli Liu, Min Tao, "Synthesis and characterization of benzoxazine monomers from rosin and their thermal polymerization", *Designed Monomers and Polymers*, 2013, vol. 17, no. 1, pp. 40–46.

37. Guiyang Yao, Yajun Li, Yongtao Zhu, Yingming Pan, Fuping Huang, Hengshan Wang, Zhixin Liao, "Protonation-controlled axial chirality in maleopimaric imides", *New Journal of Chemistry*, 2014, vol. 38, no. 2, pp. 693–699.

38. Gui-yang Yao, Man-yi Ye, Ri-zhen Huang, Ya-jun Li, Yong-tao Zhu, Ying-ming Pan, Zhi-Xin Liao, Heng-shan Wangb, "Synthesis and antitumor activity evaluation of maleopimaric acid N-aryl imide atropisomers", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, vol. 23, no. 24, pp. 6755–6758.

39. Sakhautdinov I. M., Malikova R. N., Zakir′yanova O. V., Abdullin M. F., Yunusov M. S., "Synthesis of a Bromomethylketone Based on N-Maleopimarimide and its Unusual Transformation During Preparation of Sulfonium and Phosphonium Salts", *Chemistry of Natural Compounds*, 2016, vol. 52, no. 1, pp. 78–81.

40. Sakhautdinov I. M., Gumerov A. M., Gibadullina G. G., Zakiryanova O. V., Yunusov M. S., "Synthesis of a 2,3-Dienoate Based on Methyl Maleopimarate", *Chemistry of Natural Compounds*, 2015, vol. 51, no. 2, pp. 383–384.

41. Yu J, Xu N, Liu Z, Wang L., "Novel One-Component Positive-Tone Chemically Amplified I-Line Molecular Glass Photoresists", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2012, vol. 4, no. 5, pp. 2591–2596.

42. Hess S. C., Farah M. I. S., Eguchib S. Y., Imamura P.M., "Synthetic studies with Pinus elliottiis rosin derivatives. Oxidation of maleopimaric anhydride methyl ester and trimethylfumaropimarate", *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 2000, vol. 11, no. 1, pp. 59–63.

43. Nazyrov T. I., Tret'yakova E. V., Kazakova O. B., Spirikhin L. V., Kukovinets O. S., "Regioselective oxidation of the methyl ester of maleopimaric acid by dimethyldioxirane", *Chemistry of Natural Compounds*, 2013, vol. 48, no. 6, pp. 1002–1003.

44. Yao Guiyanga, Wei Jingchena, Dai Weilonga, Yang Daa, Pan Yingminga, Wang Hengshana, "Study on the regioselectivie of Grignard reagent addition reaction of maleopimaric acid trimethyl ester", *Chinese Journal Of Organic Chemistry*, 2013, vol. 33, no. 1, pp. 138−142.

45. Tolstikov A., Karpyshev N., Tolstikova O., Khlebnikova T., Sal'nikov G., Mamatyuk V., Bagryanskaya I., Gatilov Yu., "Derivatives of L-Pimaric Acid in the Synthesis of Chiral Organophosphorus Ligands from Decahydrophenanthrene Series", *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2001, vol. 37, no. 8, pp. 1134–1148.

46. Qiang Wu, Gui-yang Yao, Ye Zhang, Heng-shan Wang, Lin Yang, Yong-tao Zhu, Ying-ming Pan, "In situ Synthesis of Rosin Derived Chiral Derivatizing Agents for 31P NMR Assays of Amine and Alcohol Enantiomers", *Chemical Research in Chinese Universities*, 2013, vol. 29, no. 5, pp. 894—899.

47. Hengshan Wang, Xiaoyan Tian, Da Yang, Ying-ming Pan, Qiang Wu, Chunhuan He, "Synthesis and enantiomeric recognition ability of 22-crown-6 ethers derived from rosin acid and BINOL", *Tetrahedron Asymmetry*, 2011, vol. 22, no. 4, pp. 381–386.

48. Liu Lu-zhi, He Chun-huan, Yang Lin, Huang Yan, Wu Qiang, Duan Wen-gui, Wang Heng-shan, Pan Ying-ming, "Novel C1-symmetric chiral crown ethers bearing rosin acids groups: synthesis and enantiomeric recognition for ammonium salts", *Tetrahedron*, 2014, vol. 70, no. 50, pp. 9545–9553.

49. Bei M. P., Azarko V. A., Yuvchenko A. P., "Synthesis, Film-Forming, and Light-Sensitivity Properties of Allyl and Propargyl Maleopimarates and Cytraconopimarates", *Russian Journal of General Chemistry*, 2010, vol. 80, no. 5, pp. 940–943.

50. Bei M. P., Yuvchenko A. P., "The synthesis of new maleopimaric acid amides and imides", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2010, no. 1, pp. 74–78.

51. Bei M. P., Yuvchenko A. P., Puchkova N. V., "Efficient Synthesis of Maleopimaric Acid N-Arylimides", *Russian Journal of General Chemistry*, 2015, vol. 85, no. 5, pp. 1034–1039.

52. Bei M. P., Yuvchenko A. P., "The new secondary terpenoid products based on renewable wood chemistry raw materials", *XIX Mendeleevskii s"ezd po obshchei i prikladnoi chimii, Volgograd, 25-30 sentiabria, 2011. Tezisy dokladov.* [XIX Mendeleev congress on general and applied chemistry, Volgograd, September 25-30, 2011. Book of abstracts], IUNL VolgGTU, Volgograd, RU, 2011, vol. 4, p. 185.

53. Bei M. P., Yuvchenko A. P., "Synthesis and Properties of Maleopimaric N-(n-Alkyl)imides", *Russian Journal of General Chemistry*, 2010, vol. 80, no. 2, pp. 253–257.

54. Bei M. P., Yuvchenko A. P., "The Synthesis of trans-1,2-Dicarboxylic Acids from Maleopimaric Acid Monoamides", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2010, no. 3, pp. 84–87.

55. Bei M. P., Yuvchenko A. P., Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie "Institut khimii novykh materialov Natsional'noi akademii nauk Belarusi", *Sposob polucheniia tsitrakonopimarovoi kisloty* [The Method for Preparation of Citraconopimaric Acid], Natsional'nyi tsentr intellektual'noi sobstvennosti, BY, Pat. 13646, 2010.

56. Bei M. P., Baranovsky A. V., Yuvchenko A. P., "Structure of a rosin-itaconic acid adduct from 2D NMR spectroscopy data", *Journal of Applied Spectroscopy*, 2009, vol. 76, no. 4, pp. 603–606.

57. Koroleva E. V., Gusak K. N., Ignatovich Zh. V., Ermolinskaya A. L., Bei M. P., Yuvchenko, "Synthesis of maleopimaric and citraconopimaric acids N-[3-(pyrimidin-2-yl)aryl]amides", *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2012, vol. 48, no. 8, pp. 1121–1125.

58. Yuvchenko A. P., Bei M. P., "The Synthesis, Properties and Use of New Secondary Terpenoid Products from Rosin", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2013, no 4, pp. 68–74.

59. Bei M. P., Yuvchenko A. P., Baranovsky A. V., "Formation of N-Alkylimides in Reaction of Maleopimaric and Citraconopimaric Acids with Secondary Amines", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2013, no 4, pp. 104–108.

60. Pesetskii S. S., Krivoguz Iu. M., Yuvchenko A. P., Bei M. P., Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie "Institut mekhaniki metallopolimernykh sistem imeni V. A. Belogo Natsional'noi akademii nauk Belarusi", Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie "Institut khimii novykh materialov Natsional'noi akademii nauk Belarusi", *Sposob polucheniia adgesiva* [The Method for Preparation of Adhesive], Natsional'nyi tsentr intellektual'noi sobstvennosti, BY, Pat. 14660, 2011.

61. Petrushenia A. F., Reviako M. M., Iatsenko V. V., Bei M. P., Iuvchenko, A. P., "Analysis of the Influence of Secondary Terpenoid Products on the Adhesion of the PE", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia fizika-tekhnichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Physico-technical series], 2012, no. 3, pp. 21–24.

62. Muravskii A. A., e. a., *Chiral'naia zhidkokristallicheskaia kompozitsiia* [Chiral LC-composition], BY, Pat. a20131038, 2013.

63. Yuvchenko A. P., Goncharova I. A., Bei M. P., Lugovneva A. P., Agabekov V. E., Kulevskaia I. V., Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie "Institut khimii novykh materialov Natsional'noi akademii nauk Belarusi", Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie "Institut mikrobiologii Natsional'noi akademii nauk Belarusi", *Antisepticheskaia kompozitsiia dlia zashchity celliulozosoderzhashchikh materialov* [Antiseptic composition for protection of cellulose materials], Natsional'nyi tsentr intellektual'noi sobstvennosti, BY, Pat. 16543, 2012.

Информация об авторах

Бей Максим Петрович – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: beymaksim@gmail.com.

Ювченко Анатолий Петрович – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, зам. директора по науч. работе, Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mixa@ichnm.basnet.by.

Сокол Ольга Валерьевна – мл. науч. сотрудник, Институт химии новых материалов НАН Беларуси, (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sokal.volha@gmail.com.

Information about the authors

Bei Maksim Petrovich – Ph.D. (Chemistry), Senior Researcher, Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36 Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: beymaksim@gmail.com.

Yuvchenko Anatolij Petrovich – Ph.D. (Chemistry), Senior Researcher, Deputy Director, Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36 Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mixa@ichnm.basnet.by.

Sokol Olga Valer'evna – Junior Researcher, Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36 Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sokal.volha@gmail.com.

For citation

Bei M. P., Yuvchenko A. P., Sokol O. V. Synthesis and properties of new derivatives of maleopimaric and citraconopimaric acids. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series, 2017, no. 2, pp. 111–125.

Для цитирования

Bei M. P., Yuvchenko A. P., Sokol O. V. Synthesis and properties of new derivatives of maleopimaric and citraconopimaric acids. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 111–125. (In Russian).

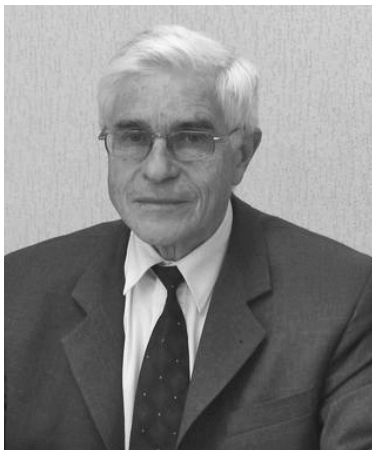
ISSN 0002-3590(print.)

ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ

SCIENTISTS OF BELARUS

ВЛАДИМИР СЕРГЕЕВИЧ СОЛДАТОВ

(К 80-летию со дня рождения)



19 мая 2017 г. исполнилось 80 лет видному белорусскому физикохимику, заслуженному деятелю науки Республики Беларусь, лауреату Государственной премии БССР, академику Национальной академии наук Беларуси, доктору химических наук, профессору Владимиру Сергеевичу Солдатову.

Трудовая деятельность В. С. Солдатова началась в 1959 г. в Институте общей и неорганической химии АН БССР. В этом институте произошло становление талантливого ученого, здесь он прошел путь до заведующего лабораторией, став кандидатом и доктором химических наук, лауреатом премии Ленинского комсомола и Государственной премии Белорусской ССР. С 1981 по 2004 г. он возглавлял Институт физико-органической химии АН Беларуси, одновременно (1988–1992 гг.) являясь вице-президентом Академии наук Беларуси. В 1977 г. ученый избирается членом-корреспондентом АН Беларуси, в 1984 г. – академиком. Сейчас В. С. Солдатов возглавляет лабораторию ионного обмена и сорбции Института физико-органической химии НАН Беларуси.

Академик В. С. Солдатов – известный в мире ученый в области ионного обмена. Им внесен существенный вклад в изучение термодинамики обмена неорганических катионов и анионов на полимерных ионитах различных типов, установлены основные закономерности этих процессов, обнаружен ряд ранее неизвестных явлений. Разработан вариант термодинамического описания ионообменных равновесий, позволяющий рассчитать термодинамические функции отдельных составляющих реальных ионообменных процессов: межфазного перераспределения ионов, переноса растворителя, изменения объема ионита. Установлено, что сильные отклонения поведения ионообменных систем вызваны взаимным влиянием ионогенных групп на энергетическое состояние друг друга, зависящее от соотношения обменивающихся ионов в фазе ионита. На основании проведенных исследований им предложена теоретическая модель этих процессов, позволяющая проводить количественное описание избирательности и термодинамических функций в зависимости от степени обмена.

Большое внимание В. С. Солдатов уделил исследованиям в области многоионных обменных равновесий. Им разработаны методы предсказания таких равновесий для систем различной степени сложности и предложен способ расчета многоионных равновесий, базирующийся на теоретической модели, предложенной ранее для бинарных систем. На основании результатов этих исследований В. С. Солдатовым были созданы искусственные питательные среды для выращивания растений на основе синтетических ионитов, насыщенных всеми необходимыми для роста растений элементами – высокопродуктивные гранульные и волокнистые ионитные почвы БИОНА. Разработаны методы и технологии их получения, эксплуатации, регенерации, активно продолжаются исследования по совершенствованию и поиску новых путей использования ионитных почв. Создававшиеся первоначально для использования в замкнутых экологических системах (орбитальные космические станции, суда дальнего плавания), ионитные почвы в последнее время находят применение в современных биотехнологиях для адаптации

и размножения различных видов растений. В настоящее время Владимир Сергеевич уделяет много внимания вопросам создания питательных сред для растениеводства на основе природных неорганических ионообменников различного химического состава.

Под руководством ученого проведены систематические исследования в области синтеза, изучения свойств и изыскания новых направлений эффективного применения волокнистых ионообменных материалов. Разработаны способы химической и радиационно-химической модификации полипропиленовых и полиакрилонитрильных волокон, которые привели к получению волокнистых аналогов ионитных смол всех основных типов. Освоены технологии промышленного синтеза и налажено производство ряда ионитных волокон ФИБАН, которые в течение ряда лет используются в процессах очистки вентиляционных выбросов и технологического воздуха промышленных и сельскохозяйственных предприятий от химически активных газов кислого и основного характера и для очистки воды от примесей ионного характера. Создана теоретическая модель для описания процесса поглощения паров воды ионитами, которая позволяет предсказать сорбционную способность материалов при поглощении аммиака, содержащегося в воздухе в крайне низких концентрациях, что актуально для обеспечения глубокой очистки технологического воздуха предприятий микроэлектроники. Разработаны сорбционно- и каталитически активные материалы на основе ионитных волокон, которые позволяют извлекать из воздушных сред ряд малодиссоциирующих и неионогенных газовых примесей, не удаляемых по механизму ионного обмена, а также сорбенты, эффективные в условиях низкой относительной влажности среды. Исследование процессов массопереноса при контакте ионитных волокон с газовоздушными системами привело к созданию промышленных газоочистных устройств фильтрационного и контактного типов с использованием ионитных волокон, которые нашли широкое применение на предприятиях Беларуси и поставляются в другие страны.

В. С. Солдатов является одним из пионеров использования методов компьютерного моделирования для установления строения ионитов и прогнозирования их физико-химических свойств. Им разработана методика квантово-химического моделирования сложных ионообменных систем, позволяющая оценивать сорбционные и ионообменные свойства полиэлектролитов в зависимости от их структуры и химического состава. Методика позволяет осуществить целенаправленный поиск структур новых высокоэффективных ионитов и сорбентов, селективных по целевому иону, без проведения длительных и трудоемких экспериментальных исследований. Созданы методики экспрессной оценки обменной емкости и параметров кислотности ионообменных материалов по данным потенциометрического титрования с использованием компьютерного моделирования, новый теоретический подход к оценке кислотно-основных свойств ионитов по параметрам кислотности присутствующих в них функциональных групп. Разработана термодинамическая и квантово-химическая модель преобладающих комплексов ионитов с водой в процессе гидратации, позволившая визуализировать их атомарное строение, состояние протона, ионов лития и натрия, а также с высокой точностью определить макроскопические свойства этих материалов. Этот результат был включен в ТОП-10 важнейших результатов НАН Беларуси за 2015 год в области фундаментальных и прикладных исследований.

Большой вклад внесен В. С. Солдатовым и его учениками в разработку способов создания и изучение свойств полимерных мембран. Найдены основные принципы выбора условий получения пористых полимерных структур с требуемыми свойствами путем варьирования природы полимера, состава растворителя и коагулянта, условий приготовления растворов, осаждения и последующей обработки мембран. Результатом проведенных исследований явилась организация первого отечественного промышленного производства микрофильтрационных мембран. Это позволило решить критичную в 80–90-е годы прошлого столетия проблему импортозамещения в области мембранных фильтрующих материалов для нужд микроэлектроники.

Академику В. С. Солдатову в его научной и научно-организационной деятельности свойственны трудолюбие, целеустремленность, глубина подходов и широта взглядов, высокая требовательность к себе и коллегам. На посту директора института он всемерно поощрял творческую активность сотрудников, во многом предвосхищая требования, предъявляемые к научным организациям в настоящее время, настойчиво проводил курс на создание в институте малотоннажных химических производств. Под непосредственным руководством В. С. Солдатова в Институте

физико-органической химии были развернуты работы по ряду актуальных научных направлений (химически активные волокнистые материалы, мембранные технологии, ионообменная экстракция и др.), ориентированных на создание материалов и технологий для современных производств и охраны окружающей среды. Эти направления во многом определяют профиль деятельности института в настоящий период.

Для В. С. Солдатова характерен широкий диапазон творческих интересов. На протяжении ряда лет он являлся руководителем, координатором, членом научных советов Государственных программ научных исследований различных уровней, председателем экспертного совета по химии Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь. Он ведет активное сотрудничество с научными организациями и предприятиями Австрии, Германии, Польши, Китая, Японии и других стран. Действительный член Европейской академии наук и искусств, почетный академик Хэнаньской академии наук (Китай). Является членом редколлегии международных журналов «Reactive and Functional Polymers», «Journal of Water Resources», «Химическая технология», «Химия и технология воды».

В. С. Солдатов – автор более 750 научных работ, патентов и авторских свидетельств на изобретения. Результаты его исследований обобщены в монографиях «Простые ионообменные равновесия» (1972), «Ионитные почвы» (1978), «Искусственные почвы для растений» (1985), «Ионообменные равновесия в многокомпонентных системах» (1988), «New materials and technologies for environmental engineering. Syntheses and structure of ion exchange fibers» (Люблин, 2004), главах коллективных монографий «Ion exchange and solvent extraction» (Нью-Йорк, 2011) и «Ion exchange technology» (Нью-Йорк, 2012). Им подготовлено 35 кандидатов и 3 доктора химических наук. Награжден орденом «Знак Почета», медалями.

Коллеги, друзья и ученики от всего сердца поздравляют Владимира Сергеевича с юбилеем и желают ему доброго здоровья, новых замыслов и свершений в работе на благо белорусской науки.

А. В. Сукало, С. А. Усанов, В. Е. Агабеков, А. В. Бильдюкевич,
О. А. Ивашкевич, В. С. Комаров, В. И. Поткин, С. К. Рахманов