ISSN 1561-8331(print.)

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК. 2017. № 3

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ ХИМИЧЕСКИХ НАУК. 2017. № 3

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, Минск, Беларусь

Редакционная коллегия:

А. В. Бильдюкевич – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь *(заместитель главного редактора)*

Н. П. Крутько – государственное научно-производственное объединение «Химические продукты и технологии», Минск, Беларусь *(заместитель главного редактора)*

Я. В. Рощина – Издательский дом «Беларуская навука», Минск, Беларусь *(ведущий редактор)*

В. Е. Агабеков – Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

А. А. **Гилеп –** Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

О. Б. Дормешкин – Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

Е. Н. Калиниченко – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

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

Р е д а к ц и о н н ы й с о в е т:

В. Балтрунас – Центр исследований природы Литвы Института геологии и географии, Вильнюс, Литва
П. Драшар – Пражский университет химии и технологии, Прага, Чехия
Л. Маркс – Варшавский университет, Варшава, Польша
В. Я. Прушак – Солигорский институт проблем ресурсосбережения с опытным производством, Солигорск, Беларусь
А. В. Рогачев – Научно-исследовательский институт физикохимии и технологии микро- и наноразмерных систем учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины», Гомель, Беларусь
Чжао Лян – Хэнаньская академия наук, Хэнань, Китай

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. № 3.
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *Я. В. Рощина*
Компьютерная вёрстка *О. А. Толстая*

Подписано в печать 18.08.2017. Выход в свет 29.08.2017. Формат 60×84 $^1/_8$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 66 экз. Заказ 149.
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 1561-8331(print.)

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

CHEMICAL SERIES, 2017, no. 3

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

Sergey A. Usanov – Academician-secretary of the Department of Chemistry and Earth Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E d i t o r i a l b o a r d:

Alexandr V. Bildyukevich – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus *(Associate Editor-in-Chief)*
Nikolai P. Krut'ko – State Research and Production Association «Chemical Products and Technologies», Minsk, Belarus *(Associate Editor-in-Chief)*
Yanina V. Roshchina – Publishing House "Belaruskaya Navuka", Minsk, Belarus (*Lead Editor)*
Vladimir E. Agabekov – Institute of New Materials Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Andrey A. Gilep – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Oleg B. Dormeshkin – Belarusian State University of Technology, Minsk, Belarus
Elena N. Kalinichenko – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Alexandr K. Karabanov – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Vasily D. Koshevar – Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Mikhail I. Kuzmenkov – Belarusian State University of Technology, Minsk, Belarus
Anatoly I. Kulak – Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Fyodor A. Lakhvich – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Vladimir G. Levashkevich – Department of Chemistry and Earth Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Ivan I. Lishtvan – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Vladimir I. Potkin – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Dmitry V. Sviridov – Belarusian State Universitv, Minsk, Belarus
Vladimir A. Khripach – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Oleg I. Shadyro – Belarusian State University, Minsk, Belarus
Vadim V. Shmanai – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

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

Baltrunas Valentinas – Lithuanian Nature Research Center of the Institute of Geology and Geography, Vilnius, Lithuania
Pavel Drasar – Prague University of Chemistry and Technology, Prague, Czechia
Victor Ya. Prushak – Soligorsk Institute of Resource Saving Problems with the Pilot Plant, Soligorsk, Belarus
Alexander V. Rogachev – Institute of Physical chemistry and Technology of Micro- and Nanoscale Systems at the Educational Institution «Francisk Skorina Gomel State University», Gomel, Belarus
Leszek Marks – University of Warsaw, Warsawa, Poland
Zhao Liang – Henan Academy of Sciences, Henan, China

Address of the Editorial Office:
1, 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. 3.
Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *Ya. V. Roshchina*
Computer imposition *O. A. Tolstaya*

It is sent of the press 18.08.2017. Appearance 29.08.2017. Format 60×84 1/8. Offset paper.
The press digital. Printed pages 14,88. Publisher`s signatures 16,4. Circulation 66 copies. Order 149.
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 1561-8331(print.)

ЗМЕСТ

ФІЗІЧНАЯ ХІМІЯ

Абакшонок А. В., Квасюк А. А., Еремин А. Н., Агабеков В. Е. Получение частиц диоксида церия и их антиоксидантная активность 7

Самойленко О. А., Солдатов В. С., Нестеронок П. В. Потенциометрическое титрование природных клиноптилолитов. 17

НЕАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Борзых М. М., Акулич Н. Е., Матыс В. Г., Иванова Н. П., Кандидатова И. Н., Ашуйко В. А. Ингибиторная защита оцинкованной стали ванадатом натрия 22

КАЛОІДНАЯ ХІМІЯ

Опанасенко О. Н., Яковец Н. В., Крутько Н. П. Поверхностные свойства анионно-ориентированных цвиттер-ионных ПАВ на основе аминов и карбоновых кислот 29

АНАЛІТЫЧНАЯ ХІМІЯ

Матвейко Н. П., Кулак А. И., Протасов С. К., Садовский В. В. Инверсионно-вольтамперометрическое определение тяжелых металлов в растительных маслах 38

Шиш С. Н., Шутова А. Г., Скаковский Е. Д., Тычинская Л. Ю. Состав водных экстрактов соцветий календулы методом ЯМР 45

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Akayeu Ya. B. Synthesis of new highly lypophilic ethoxylated ionic liquids as promising active components for ion selective electrodes (Синтез высоколипофильных этоксилированных ионных жидкостей – перспективных активных компонентов мембран ионоселективных электродов) 53

Куваева З. И., Лопатик Д. В., Бондарева О. М., Сивчик В. В. Синтез фосфорилированных аминокислот .. 58

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Вашкевич И. И., Ястребова А. А., Куприенко О. С., Корнилович Г. С., Сухенко Л. Н., Шибеко А. И., Свиридов О. В. Реагенты для иммуноферментного определения токсина Т-2 в кормах и пищевых продуктах 63

Мартыненко-Макаев Ю. В., Брылев В. А., Удодова В. В. Дублер-красители для усиления флуоресценции ДНК-зондов в молекулярной диагностике 72

Станишевский С. Б., Иванчик А. В., Шапиро М. А., Янцевич А. В., Сыса А. Г. Белковое профилирование клеток HepG2 с использованием «Shotgun» протеомики как метод, применимый для исследования биоптатов 79

ХІМІЯ ВЫСОКАМАЛЕКУЛЯРНЫХ ЗЛУЧЭННЯЎ

Горбачев А. А., Шейпак Т. М., Данильчик А. В., Луценко Е. В., Третинников О. Н. Фотоиндуцированная прививочная полимеризация на поверхности под действием высокоинтенсивного УФ-излучения 85

ГЕАХІМІЯ

Михальчук Н. В. Подвижные формы тяжелых металлов и микроэлементов в почвах карбонатного ряда юго-запада Беларуси 90

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

Гончарик И. И., Шевчук В. В., Кудина О. А., Можейко Ф. Ф. Получение сульфата калия взаимодействием хлорида калия и сульфата кальция 98

Клебеко П. А., Романовский В. И. Очистка подземных вод от железа модифицированными антрацитами 104

Латышевич И. А., Прокопчук Н. Р., Клюев А. Ю., Козлов Н. Г. Свойства лаковых покрытий на основе модифицированных терпеномалеиновых смол 110

АГЛЯДЫ

Литвинко Н. М. Прикладная энзимология фосфатидацилгидролаз в изучении взаимосвязи «структура–функция» в ряду биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов 115

ISSN 1561-8331(print.)

CONTENTS

PHYSICAL CHEMISTRY

Abakshonok A. V., Kvasyuk A. A., Eryomin A. N., Agabekov V. E. Preparation of ceria particles and their antioxidant activity 7

Samoilenko O. A., Soldatov V. S., Nesteronok P. V. Potentiometric titration of natural clinoptilolites 17

INORGANIC CHEMISTRY

Borzyh M. M., Akulich N. E., Matys V. G., Ivanova N. P., Kandidatova I.N., Ashuiko V. A. Corrosion inhibition of Zn-plated steel by sodium vanadate 22

COLLOIDAL CHEMISTRY

Opanasenko O. N., Yakavets N. V., Krut'ko N. P. Surface properties of anionically-oriented zwitterionic surfactants based on amines and carboxylic acids 29

ANALYTICAL CHEMISTRY

Matveiko N. P., Kulak A. I., Protasov S. K., Sadowski V. V. Stripping voltammetric determination of heavy metals in vegetable oils 38

Shysh S. N., Shutava H. G., Skakovski E. D., Tychinskaya L. Yu. NMR investigation of the composition of aqueous extracts from pot marigold inflorescence 45

ORGANIC CHEMISTRY

Akayeu Ya. B. Synthesis of new highly lypophilic ethoxylated ionic liquids as promising active components for ion selective electrodes 53

Kuvaeva Z. I., Lopatik D. V., Bondareva O. M., Sivchik V. V. Synthesis of phosphorylated amino acids 58

BIOORGANIC CHEMISTRY

Vashkevich I. I., Yastrebova A. A., Kuprienko O. S., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. Reagents for an enzyme immunoassay of T-2 toxin in feeds and foods 63

Martynenko-Makaev Y. V., Brylev V. A., Udodava V. V. Enhancing the fluorescence of DNA-probes for molecular diagnostics 72

Stanisheuski S. B., Ivanchyk A. V., Shapira M. A., Yantsevich A. V., Sysa A. G. Shotgun proteomic profiling of HepG2 cell line as a method applicable for biopsy specimen analysis 79

POLYMER CHEMISTRY

Gorbachev A. A., Sheipak T. M., Danilchyk A. V., Lutsenko E. V., Tretinnikov O. N. UV-induced graft polymerization on surface under high-power UV irradiation and the properties of the surface-grafted polymer 85

GEOCHEMISTRY

Mikhalchuk N. V. Mobile forms of heavy metals and trace elements in carbonate range soils of the southwest part of Belarus 90

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING

Goncharik I. I., Shauchuk V. V., Kudzina O. A., Mozheyko F. F. Preparation of potassium sulfate in a reaction of potassium chloride and calcium sulfate 98

Klebeko P. A., Romanovsky V. I. Cleaning the ground water from iron using modified anthracite 104

Latyshevich I. A., Prokopchuk N. R., Kliuyeu A. Yu., Kozlov N. G. Properties of the laquer coatings based on modified terpenomaleinic resins 110

REVIEWS

Litvinko N. M. Applied enzymology of phosphatidacylhydrolases in a study of the structure-function relationship in the series of biopolymers and low-molecular bioregulators 115

ISSN 1561-8331(print.)

ФІЗІЧНАЯ ХІМІЯ

PHYSICAL CHEMISTRY

УДК 544.774.4+546.655+577.152.193

Поступила в редакцию 28.10.2016
Receiver 28.10.2016

А. В. Абакшонок, А. А. Квасюк, А. Н. Еремин, В. Е. Агабеков

Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ ЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ И ИХ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

Аннотация: В водно-аммиачной среде, в том числе содержащей пероксид водорода или цитрат натрия, синтезированы частицы диоксида церия. Полученные золи выдерживали 6 ч при комнатной температуре, обрабатывали ультразвуком (УЗ) или кипятили под давлением (~80 кПа). После УЗ обработки интенсивность поглощения частиц увеличилась в 3,4–3,7 раза по сравнению с выдержанными при комнатной температуре или подвергнутые термообработке под давлением. Добавка H_2O_2 или $Na_3C_6H_5O_7$ в среду синтеза уменьшает средний гидродинамический диаметр частиц (116–216 нм) и индекс полидисперсности золя (0,18–0,27) в водной среде. Полученные оксидные цериевые частицы окисляют 2,2-азино-*бис*(3-этил-бензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) и разлагают H_2O_2. Наибольшую «оксидазную» активность проявили частицы, обработанные УЗ. Их «каталазная» активность снижается с увеличением концентрации H_2O_2.

Ключевые слова: наночастицы, диоксид церия, синтез, антиоксидантная активность

Для цитирования: Получение частиц диоксида церия и их антиоксидантная активность / А. В. Абакшонок [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 7–16.

A. V. Abakshonok, A. A. Kvasyuk, A. N. Eryomin, V. E. Agabekov

Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

PREPARATION OF CERIA PARTICLES AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY

Abstract: Ceria particles were synthesized in the aqueous ammonia solution in presence of hydrogen peroxide or sodium citrate. The obtained sols were exposed at room temperature for 6 hours, then treated with ultrasound or heated under pressure (~80 kPa). After sonication the absorption intensity of the particles increased by 3.4–3.7 times, as compared to the particles aged at room temperature or heated under pressure. Addition of H_2O_2 or $Na_3C_6H_5O_7$ in the synthesis medium leads to the reduction of hydrodynamic diameter of particles (116–216 nm) and polydispersity index of the sol (0,18–0,27). The resulting ceria particles are able to oxidize 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and decompose H_2O_2. The highest «oxidase» activity showed the particles treated with ultrasound. Their «catalase» activity decreases with the increase of H_2O_2 concentration.

Keywords: nanoparticles, cerium dioxide, synthethis methods, antioxidant activity

For citation: Abakshonok A. V., Kvasyuk A. A., Eryomin A. N., Agabekov V. E. Preparation of ceria particles and their antioxidant activity. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 7–16 (In Russian).

Введение. Наночастицы (НЧ) диоксида церия применяются в сенсорах, электрохромных и противокоррозионных покрытиях, входят в состав катализаторов селективного окисления и дегидрогенизации, а также используются в биологических и медицинских приложениях, так как отличаются низкой токсичностью [1–6].

Подготовке цериевых частиц методом осаждения уделяется значительное внимание, так как это простой подход, перспективный для крупномасштабного производства [6–9]. Синтез сферического наноразмерного оксида церия в водном растворе $Ce(NO_3)_3$ путем гомогенного аммиачного осаждения отличается низкой стоимостью и безопасностью для окружающей среды [8, 9]. Формировать $Ce(O)_x(OOH)_{4-x}$ можно как в присутствии одного минерализатора [8, 9], когда синтез обусловлен только -OH лигандами, так и в смеси минерализатора и окислителя, в качестве

которого используется H_2O_2 [10, 11]. В работе [9] путем гомогенного осаждения с применением аммиака получены 4–5 нм сферические нанокристаллы преимущественно четырехвалентного оксида церия, содержащего также Ce_2O_3 и кислородные вакансии. Этим же методом при 35–80 ºС синтезированы цериевые нанокристаллы, размер которых линейно увеличивался от 4,8 до 8,5 нм с ростом температуры среды синтеза [8]. В работе [10] исследована подготовка CeO_2 из раствора $Ce(NO_3)_3$, смешанного с H_2O_2 при 5 ºС, к которому затем добавлен NH_4OH для увеличения pH и полного осаждения частиц. В этом случае образование цериевых частиц находится под влиянием двух лигандов -OOH и -OH. После сушки частиц при 80–85 ºС получены слабоагломерированные порошки с размером кристаллитов < 5 нм. В той же самой системе после гидротермальной обработки золя размер кристаллитов был в пределах 6–12 нм и зависел от концентрации H_2O_2 [11].

Биологическое применение нанокристаллического диоксида церия, кроме низкой токсичности, определяется его кислородной нестехиометрией, которая является основой участия частиц в инактивации активных форм кислорода [1–6]. Окислительно-восстановительный цикл между состояниями окисления Ce(III) и Ce(IV) позволяет цериевым частицам каталитически реагировать с супероксидом и пероксидом водорода, имитируя два ключевых антиоксидантных фермента – супероксиддисмутазу и каталазу. Эти частицы после участия в окислительно-восстановительном процессе постепенно возвращаются к исходному состоянию кислородной нестехиометрии [2, 4].

С уменьшением размера цериевых частиц увеличивается относительное содержание Ce(III) и наблюдается значительная кислородная нестехиометрия вследствие потери кислородных атомов [2, 4, 5]. Концентрация как Ce(III), так и кислородных вакансий на поверхности частиц увеличивается, когда оксид церия подвергается воздействию воды [5]. Кислородная нестехиометрия диоксида церия коррелирует с его каталитической активностью. Уменьшение размера цериевых частиц сопровождается ростом их способности разлагать H_2O_2 [2]. «Каталазная» активность цериевых частиц обусловлена наличием на их поверхности Ce^{4+} ионов [4, 5], которые проявляют сильную тенденцию формировать комплексы. «Каталазная» активность цериевых частиц зависит как от содержания на их поверхности Ce(IV), так и pH раствора, увеличиваясь при pH > 7, но практически не проявляясь в подкисленной среде [2, 4]:

$$2Ce^{4+} + H_2O_2 + 2OH^- \rightarrow 2Ce^{3+} + 2H_2O + O_2. \quad (1)$$

Чувствительность к изменению pH возрастает с уменьшением размера цериевых частиц [4], которые могут быть обратимо окислены в устойчивую Ce(IV) форму пероксидами и супероксидами [1, 4]. В водной среде образующийся Ce(III) окисляется H_2O_2 [4, 5, 10]. Однако это медленный процесс, протекающий через образование на поверхности частиц моноперокситригидроксида церия [4]:

$$Ce(OH)_3 + H_2O_2 \rightarrow Ce(OH)_2OOH + H_2O, \quad (2)$$

$$3Ce(OH)_2OOH + H_2O \rightarrow 2Ce(OH)_3OOH + Ce(OH)_3, \quad (3)$$

$$2Ce(OH)_3OOH \rightarrow 2Ce(OH)_4 + O_2. \quad (4)$$

В водной среде в присутствии H_2O_2 цериевые частицы проявляют Фентон-подобную активность [12] и катализируют деградацию кислого оранжевого 7, метилового оранжевого, метилового красного, салициловой кислоты [13]. В системах с pH < 6 цериевые частицы проявляют «оксидазную» активность и окисляют пероксидазные субстраты [2, 5, 14], в частности 2,2-азино-*бис*(3-этил-бензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) (АБТС) до метастабильного катион-радикала $АБТС^{\bullet+}$ [2]. Кроме того, у цериевых частиц обнаружена способность инактивировать супероксид-анион и гидроксил-радикал [2, 4, 6].

Цель настоящей работы – синтез цериевых частиц в водно-аммиачной среде и установление влияния способов обработки полученного золя на его антиоксидантную активность.

Экспериментальная часть. В работе использовали гексагидрат нитрата церия фирмы «Fluka» (Франция), 2,2-азино-*бис*(3-этилбензоил-6-сульфоновую кислоту) («Sigma», США), реактивы производства «Реахим» (Россия), ультразвуковую ванну Elmasonic S 30 H (Германия), характеризующуюся частотой 37 кГц, эффективной мощностью 60 Вт и максимальной пиковой мощностью 240 Вт. Спектры поглощения регистрировали на спектрофлуориметре СМ 2203 («SOLAR», Беларусь). Дзета-потенциал и гидродинамический диаметр частиц определяли с помощью Zetasizer Nano («Malvern Instruments», Великобритания). Размер и форму цериевых частиц оценивали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) («JIM/100SX», Япония).

Синтез цериевых частиц в водно-аммиачном растворе проводили по схеме:

$[H_2O$ + аммиак$]$

↓ + $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$

↓ Способы последующей обработки $Ce(OH)_3$ золя:

1. Магнитная мешалка, комнатная температура, 6 ч	2. УЗ обработка, 6 ч, 18–65 ºС	3. Кипячение под давлением, 6 ч

↓ Центрифугирование золя (15000 об/мин, 10 мин)

↓ Промывка осадка дистиллированной водой и его диспергирование в 1,0 мМ цитрате натрия

↓

Цериевые частицы

Синтез цериевых частиц проводили в ледяной бане, последовательно смешивая аликвоты дистиллированной воды, аммиака и по каплям добавляя водный раствор азотнокислого церия. Концентрация $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ составляла 5,0 мМ, а NH_4OH – 2,0 М. Образовавшийся золь первые 10 мин перемешивали на магнитной мешалке на ледяной бане, а затем в течение 6 ч при комнатной температуре (способ 1), или же обрабатывали 6 ч ультразвуком (УЗ) при увеличении температуры от 18 до 65 ºС (способ 2), или кипятили 6 ч под давлением ~80 кПа в бытовой скороварке (способ 3). Золи центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин. Супернатант удаляли, а осадки промывали 3 раза дистиллированной водой и диспергировали в водном растворе 1,0 мМ цитрата натрия.

Получение цериевых частиц в среде, содержащей пероксид водорода или цитрат натрия, отличается от данной схемы только тем, что вначале готовили охлажденный водный раствор, содержащий $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ и H_2O_2 (или цитрат натрия), и выдерживали его 20 мин на ледяной бане, а затем добавляли аликвоту аммиака. Концентрации компонентов при осаждении цериевых частиц были равны: 10 мМ H_2O_2 (или 1,0 мМ $Na_3C_6H_5O_7$), 5,0 мМ $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ и 2,0 М NH_4OH. Обработку полученного золя, очистку цериевых частиц и их диспергирование проводили по ранее приведенной схеме.

«Оксидазную» активность цериевых частиц определяли в 50 мМ цитрат-фосфатном буфере, pH 3,0, содержащем 0,01–0,07 мМ АБТС и цериевые частицы, которые разводили в 200 раз. В качестве контрольного использовали раствор, не содержащий частиц. Контрольный и опытный растворы выдерживали 60 мин при 40 ºС, а затем регистрировали их спектры поглощения. Концентрацию катион-радикала АБТС рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции, равный $3{,}6 \times 10^4$ $М^{-1}см^{-1}$ [15].

«Каталазную» активность цериевых частиц определяли в водном растворе, содержащем 3–20 мМ H_2O_2 и золь частиц в среде синтеза, разведенный в 500 раз. За расходованием H_2O_2 следили по уменьшению поглощения при длине волны 240 нм.

Результаты и их обсуждение. Методы, основанные на осаждении цериевых частиц в гидратированной форме из растворов солей церия (III) при добавлении сильных оснований, являются наиболее распространенными [3, 4, 6]. Осаждение частиц протекает в неравновесных условиях по механизму автокатализа с самоускорением, так как произведения растворимости гидроксида церия (III) и диоксида церия крайне малы [2]. В кислородсодержащей среде при комнатной температуре образование цериевых частиц методом аммиачного осаждения описывается реакциями:

$$Ce(NO_3)_3 + 3NH_4OH = Ce(OH)_3 + 3NH_4NO_3 , \quad (5)$$

$$4Ce(OH)_3 + O_2 = 4CeO_2 + 6H_2O . \quad (6)$$

Осадок, образующийся в первые минуты после добавления аммиака, представляет собой гидратированный диоксид церия $CeO_2 \times nH_20$, содержащий смесь кристаллических фаз диоксида церия и гидроксида церия (III) [3, 10].

Цериевые частицы, сформированные по схеме. Эффективность образования цериевых частиц зависит от начальной концентрации $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$. Формирование золя при комнатной температуре и концентрациях $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ < 8 мМ завершается в течение 1 ч, а при 15 мМ для этого необходимо около 2 ч. Сначала образуется светло-розовый золь, но к концу процесса цвет изменяется на светло-желтый, свидетельствуя о наличии в образце Ce(IV). В спектре поглощения золя, полученного в среде 15 мМ $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$, имеется ярко выраженное плато в области 500–650 нм, свидетельствующее о наличии агрегированных частиц. Выход цериевых частиц увеличивается при изменении отношения $[NH_4OH]$ / $[Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O]$ от 0,9 до 9,1, достигая максимальной величины при 30-кратном избытке NH_4OH. Если золь получен при отношении $[NH_4OH]$ / $[Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O]$, равном ~1, то он флуоресцирует с максимумом при 369 нм ($\lambda_{возб}$ = 300 нм).

Для повышения кристалличности и снижения количества гидроксильных групп на поверхности цериевых частиц щелочные золи подвергали разным способам обработки. Способами 1 и 2 (схема) получены светло-желтые золи, а в случае способа 3 – бело-серый золь аморфных частиц. После УЗ обработки (способ 2) цериевые частицы отличаются в 3,4–3,7 раза большей интенсивностью поглощения, чем выдержанные при комнатной температуре (способ 1) или подвергнутые термообработке под давлением (способ 3) (табл. 1). Очистка УЗ обработанных образцов методом центрифугирования в условиях 15000 об/мин 10 мин сопровождается потерей малоразмерных частиц, что отражает уменьшение интенсивности поглощения частиц (табл. 1). Оптические спектры поглощения разных образцов цериевых частиц аналогичны по форме и отличаются лишь интенсивностью поглощения (рис. 1).

Таблица 1. **Максимум и интенсивность поглощения цериевых частиц, разведенных в 10 раз, в среде синтеза (*) и очищенных в водном растворе 1,0 мМ цитрата натрия (**)**

Table 1. **Absorption maximum and absorption intensity of the 10 times diluted ceria particles in the synthesis medium (*) and purified in aqueous solution of 1.0 mM sodium citrate (**)**

Способ обработки золя	λ^*_{max}, нм	D^*_{max}	λ^{**}_{max}, нм	D^{**}_{max}
Синтез по схеме				
1	284–288	0,56–0,57	292–294	0,61–0,64
2	288–290	1,80м2,00	287–291	1,10–1,15
3	284–285	0,50–0,54	291–294	0,41–0,50
Синтез в среде с H_2O_2				
1	284	1,33–1,34	283–284	1,48–1,50
2	291–293	1,62–2,08	284–291	1,76–1,85
3	290–297	1,93–2,16	294	1,08-1,59

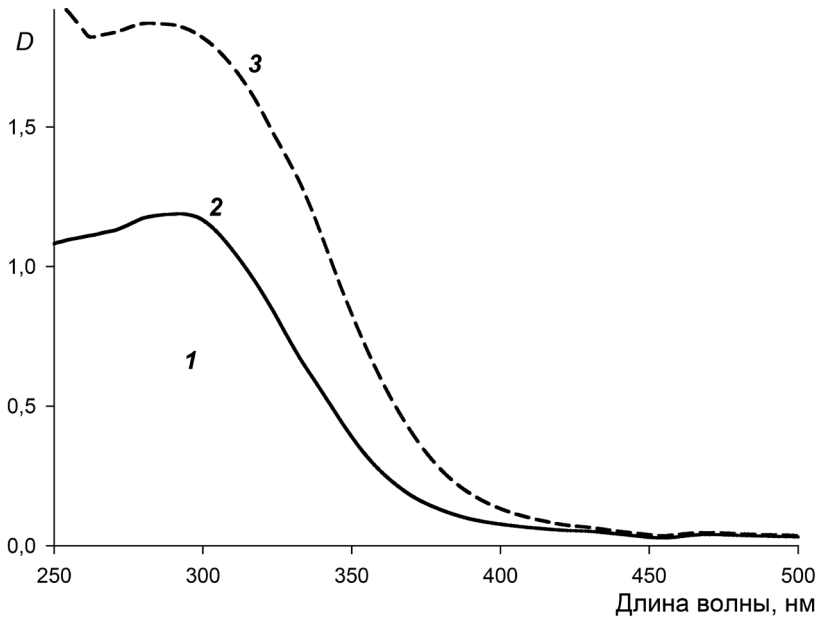


Рис. 1. Спектры поглощения цериевых частиц, полученных по схеме способами 1 (*1*), 2 (*2*) и в присутствии H_2O_2 способом 2 (*3*), диспергированных в водном растворе 1,0 мМ цитрата натрия

Fig. 1. Absorption spectra of ceria particles obtained according to the Scheme by the methods of 1 (*1*) and 2 (*2*) and in the presence of H_2O_2 by method 2 (*3*), dispersed in an aqueous solution of 1.0 mM sodium citrate

Полученный золь содержит цериевые частицы размером 2–3 нм (рис. 2), которые агломерируют как на медной подложке (рис. 2, *а*), так и в водной среде (рис. 2, *б*). Молекулярно-массовое распределение (полидисперсность) указывает на то, что способы 1 и 3 приводят к агломерированным частицам: их индекс полидисперсности равен 0,40 и 0,72 соответственно (табл. 2). Соотношение количества частиц различной массы в золе, выдержанном при комнатной температуре, увеличивается в 1,6 раза при его 100-кратном разведении дистиллированной водой, а величина дзета-потенциала, наоборот, уменьшается до –30,8 мВ (табл. 2). Это, по-видимому, связано с внедрением противоионов в адсорбционный слой и частичной компенсацией заряда потенциалопределяющих ионов. В этих условиях (способ 1) средний гидродинамический диаметр цериевых частиц увеличивается в два раза (табл. 2). В золе, сформированным способом 3, обнаруживаются три фракции частиц, которые отличаются диаметром: 30–150 нм, 400–450 и >3000 нм. Большее количество частиц содержится в первой фракции (рис. 2, *б*, кривая *3*). Агломераты цериевых частиц наиболее эффективно разрушаются при УЗ обработке золя (способ 2) – средний гидродинамический диаметр этих частиц наименьший (табл. 1). Следовательно, УЗ обработка является более эффективной, так как обеспечивает разрушение большеразмерных агломератов цериевых частиц. В результате образуются светло-желтые частицы с гидродинамическим диаметром в пределах 35–150 нм (рис. 2, *б*, кривая *2*).

«Оксидазную» активность цериевых частиц определяли, используя АБТС. В его спектре поглощения в 50 мМ цитрат-фосфатном буфере, pH 3,0, имеется максимум при 341 нм. Выдерживание цериевых частиц, полученных по схеме, в среде с АБТС сопровождается увеличением поглощения при ~408 нм (рис. 3, *а*), что указывает на продукт его окисления – катион-радикал $АБТС^{\bullet+}$ [2]. Окислителем являются цериевые частицы, у которых поверхностные атомы Ce^{4+} восстанавливаются до Ce^{3+}. Эффективность окисления АБТС увеличивается прямо пропорционально температуре (рис. 3, *б*) и времени (рис. 3, *в*) выдерживания реакционного раствора. Частицы церия, полученные способом 1, через 11 сут хранения проявили наименьшую «оксидазную» активность, в то время как у частиц, сформированных способами 2 и 3, она выше в 1,4 и 2,0 раза соответственно.

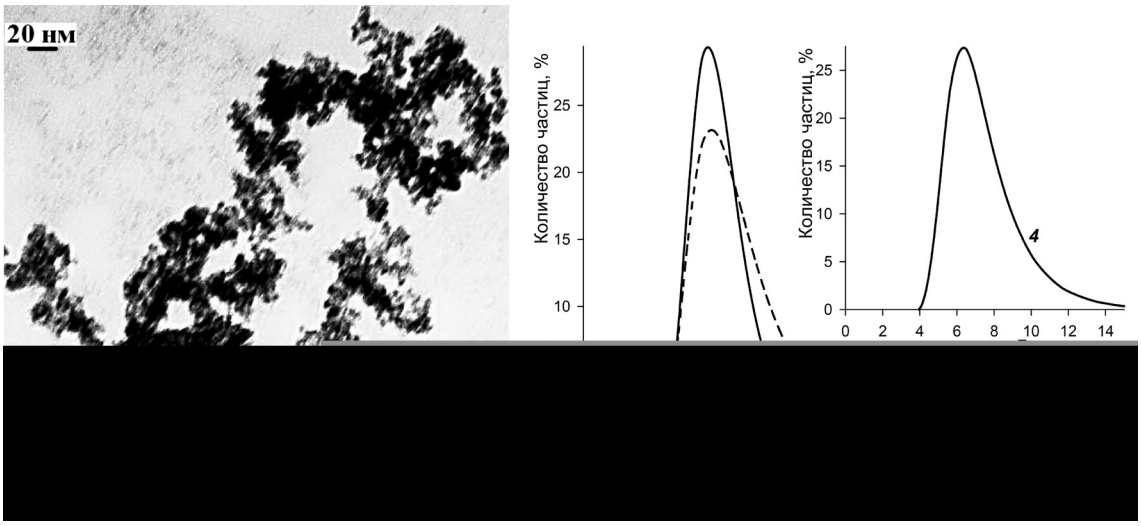


Рис. 2. ПЭМ изображение цериевых частиц, полученных по схеме способом 2 (*а*). Распределение количества цериевых частиц в зависимости от их гидродинамического диаметра в очищенных золях (*б*): схема, способы 1 (*1* – без добавки и *4* – в присутствии H_2O_2), 2 (*2*) и 3 (*3*)

Fig. 2. TEM image of ceria particles obtained according to Scheme by the method 2 (*a*) and the particle hydrodynamic diameter in purified sols (*б*): Scheme, methods of 1 (*1* – without additives and *4* – in presence of H_2O_2), 2 (*2*) and 3 (*3*)

Таблица 2. **Дзета-потенциал и средний гидродинамический диаметр очищенных цериевых частиц**

Table 2. **Zeta potential and average hydrodynamic diameter of purified ceria particles**

Способ	Разведение золя в разы	Дзета-потенциал, мВ	Диаметр частиц, нм	Индекс полидисперсности (PdI)
Синтез по схеме				
1	0	–45,0±0,3	223	0,402
	100	–30,8±2,9	446±33	0,64±0,04
2	0	–45,7±2,8	151±37	0,29±0,09
3	0	–35,7±0,6	297±16	0,72±0,01
Синтез в среде с H_2O_2				
1	10	–30,6±7,2	216±20	0,27±0,09
2	10	–43,3±2,2	116±18	0,21±0,02
3	10	–33,5±5,8	135±12	0,18±0,01

Рис. 3. Спектры поглощения (*а*) реакционных растворов после 60 мин выдерживания их при температуре 20 (*1*), 40 (*2*) и 60 ºС (*3*) и их интенсивность поглощения при 408 нм в зависимости от температуры (*б*) и времени (*в*) выдерживания реакционного раствора при 40 ºС: *1* – 321 и *2* – 408 нм

Fig. 3. Absorption spectra (*a*) of the reaction solutions after 60 min of incubation at 20 (*1*), 40 (*2*) and 60 °C (*3)* and the absorption intensity at 408 nm versus temperature (*б*) and time of reaction solution soaking at 40 °C (*в*): *1* – 321 and *2* – 408 nm

Цериевые частицы, полученные в среде с $\mathbf{H_2O_2}$ ***или*** $\mathbf{Na_3C_6H_5O_7}$**.** На кислородную нестехиометрию цериевых частиц можно воздействовать, добавляя пероксид водорода в среду их синтеза [2, 10]. Пероксид водорода действует как окислитель Ce(III), комплексообразующий и осаждающий лиганд, способный разлагаться без загрязнения среды. Однако при низкой температуре H_2O_2 не способен осадить все ионы церия из раствора [10]. Их полное осаждение с образованием оранжево-желтого осадка достигается, если использовать совместно H_2O_2 и NH_4OH. Аммиак также препятствует образованию плотных агломератов, формируемых при H_2O_2 осаждении цериевых частиц [10]. Золь цериевых частиц, полученный способом 2 в присутствии H_2O_2, включает, по-видимому, $Ce(OH)_3OOH$ [10] и имеет яркий желто-оранжевый цвет, а в результате обработок способами 1 и 3 образуются светло-желтые золи Ce(IV). Цериевые частицы, полученные в среде H_2O_2 способами 1 и 3, отличаются в 2,4 и 3,9 раза большей интенсивностью поглощения, чем аналогичные частицы, сформированные согласно схеме (табл. 1, рис. 1, спектры *2* и *3*). Следовательно, добавка H_2O_2 позволяет увеличить выход цериевых частиц.

Индекс полидисперсности (PdI) цериевых частиц, полученных с H_2O_2, в целом ниже, чем синтезированных согласно схеме (табл. 2). Особенно существенной является разница PdI в случае способа 3. Обработка золя УЗ нивелирует различия между цериевыми частицами, сформированными по схемам 1 и в присутствии H_2O_2, но все же лиганды -OOH в среде синтеза обеспечивают образование частиц с меньшим средним гидродинамическим диаметром (табл. 2).

«Оксидазную» активность цериевых частиц (разведение 200 раз), полученных в среде с H_2O_2, характеризовали при 30 ºС в 50 мМ цитрат-фосфатном буфере, pH 3,0, содержащем 0,05 мМ АБТС. Спектр поглощения опытного раствора, включающего цериевые частицы, против контрольного, не содержащего их, регистрировали через 15 мин. В результате окисления АБТС уменьшается интенсивность поглощения при 333–336 нм, но проявляется максимум поглощения катиона-радикала $АБТС^{\bullet+}$ при 415 нм (рис. 4, *а*). «Оксидазная» активность цериевых частиц, полученных способом 1, уменьшается во времени, а в случае частиц, сформированных способом 3, возрастает (рис. 3, *б*). Однако наибольшую «оксидазную» активность проявили цериевые частицы, обработанные УЗ (способ 2). Следовательно, этот способ, независимо от схемы получения, приводит к цериевым частицам, отличающимся стабильной «оксидазной» активностью, в то время как частицы способа 1 теряют оксидазную активность при хранении.

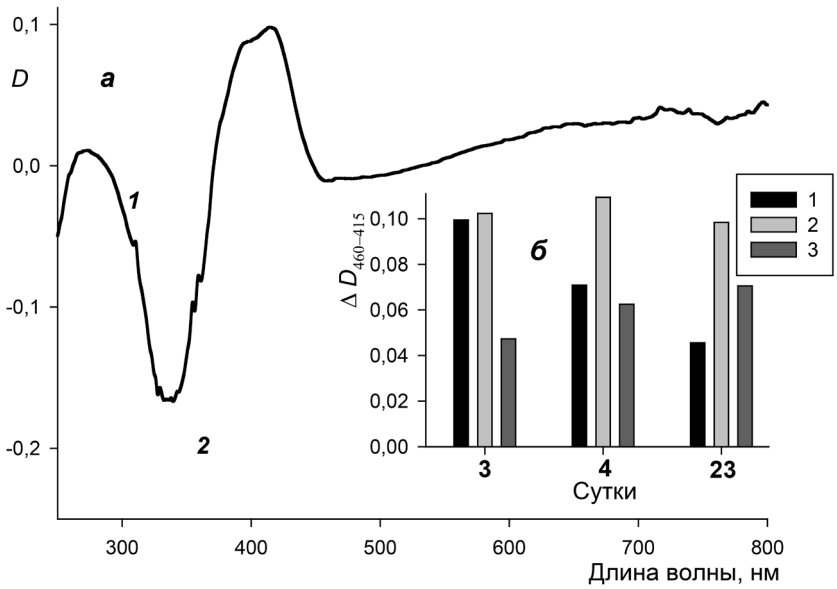


Рис. 4. Спектры поглощения (*а*) реакционных растворов, содержащих цериевые частицы, обработанные УЗ, и зависимость интенсивности поглощения продукта оксидазной реакции от времени хранения частиц (*б*), полученных способами 1–3

Fig. 4. The absorption spectra (*a*) of the reaction solutions containing ceria particles treated with ultrasound and the dependence of the oxidase reaction products absorption intensity versus the storage time (*б*) for the particles obtained by methods 1–3

отличает КП от органических катионитов, для которых уменьшение концентрации поддерживающего электролита сдвигает КПТ в сторону больших значений pH почти на порядок.

Из таблицы видно, что все исследуемые КП характеризуются обменными местами с примерно одинаковым pK, что означает, что их обменные центры одинаковы. Они различаются содержанием слабокислотных групп. В настоящее время не ясно, чем вызвано это различие. Оно может быть связано не только с термодинамическими свойствами группы, но и кинетическими затруднениями обмена на труднодоступных обменных местах.

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22-25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. Брек, Д. Цеолитовые молекулярные сита / Д. Брек. – М.: Недра, 1983. – 647 с.

2. Цицишвили, Г. В. Природные цеолиты / Г. В. Цицишвили, Г. Т. Андроникошвили, Т. Н. Кторов. – М.: Химия, 1985. – 233 с.

3. Романов, Г. А. Цеолиты: эффективность и применение в сельском хозяйстве / Г. А. Романов. – М., 2000.

4. Ануров, С. А. Изотермы адсорбции сернистого ангидрида на природном цеолите / С. А. Ануров, Н. В. Кельцев, Н. С. Тороченшиков // Труды МХТИ им. Д. М. Менделеева. – 1974. – № 79. –С. 3–4.

5. Ануров, С. А. Динамика адсорбции сернистого ангидрида природным цеолитом / С. А. Ануров, И. А. Белицкий, И. Д. Кравцова // Труды МХТИ им. Д. М. Менделеева. – 1974. – № 79. – С. 5–7.

6. Челищев, Н. Ф. Клиноптилолит / Н. Ф. Челищев, В. Г. Беренштейн. – М.: ВИЭМС, 1974. – 40 с.

7. Кочкин, Ю. Н. Влияние спектра кислотности цеолитов различного структурного типа на их каталитические характеристики в реакции синтеза этил-трет-бутилового эфира / Ю. Н. Конкин, Н. В. Власенко // Теорет. и эксперим. химия. – 2002. – Т. 38, № 2. – С. 120–124.

8. Исследование кислотности цеолитсодержащих катализаторов методом люминисцентной спектроскопии / А. М. Еременко [и др.] // Теорет. и эксперим. химия. –1977. – Т. 13, №4. – С. 549–553.

9. Сайт агрохимии [Электронный ресурс] / Режим доступа: http://agrohimija.ru/ceolity/2411-harakteristika-sorbcionnoy-sposobnosti-prirodnyh-ceolitov.html. – Дата доступа: 07.10.2016.

10. Эффективность использования природных минералов при локализации последствий радиоактивных загрязнений в ходе возникающих техногенных катастроф / А. С. Панасюгин [и др.] // Сб. тез. докл. III Междунар. науч.-практ. конф. «Экология и защита окружающей среды», 19 мая 2016. – М., 2016. – С. 228–230.

11. Солдатов, В. С. Быстрое потенциометрическое тирование ионитов / В. С. Солдатов, З. И. Сосинович, Т. А. Коршунова // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2001. – Т. 45, № 2. – С. 71–74.

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

13. Сайт Nester [Электронный ресурс] / Режим доступа: http://copoka.by/nester/ – Дата доступа: 10.10.2016.

References

1. Brek D., *Tseolitovye molekuliarnye sita* [Zeolite molecular sieves], Nedra, Moscow, RU, 1983.

2. Tsitsishvili G. V., Andronikoshvili G. T., Ktorov T. N., *Prirodnye tseolity* [Natural zeolites], Khimiia, Moscow, RU, 1985.

3. Romanov G. A., *Tseolity: effektivnost' i primenenie v sel'skom khoziaistve* [Zeolites: efficiency and application in agriculture], Moscow, RU, 2000.

4. Anurov S. A., Kel'tsev A. V., Torocheshnikov N. S., "Adsorption isotherms of sulfurous anhydride on natural zeolite", *Trudy Instituta / Ministerstvo vysshego i srednego spetsial'nogo obrazovaniia SSSR, Moskovskii khimiko-tekhnologicheskii institut imeni D. I. Mendeleeva* [Proceedings of the Institute / Ministry of Higher and Secondary Special Education of the USSR, Moscow Chemical Technology Institute named after D. I. Mendeleyev], 1974, vol. 79, pp. 3–4.

5. Anurov S.A., Belitskii I.A., Kravtsova I.D., Kel'tsev A. V., "Dynamics of sulfur dioxide adsorption by natural zeolite", *Trudy Instituta / Ministerstvo vysshego i srednego spetsial'nogo obrazovaniia SSSR, Moskovskii khimiko-tekhnologicheskii institut imeni D. I. Mendeleeva* [Proceedings of the Institute / Ministry of Higher and Secondary Special Education of the USSR, Moscow Chemical Technology Institute named after D. I. Mendeleyev], 1974, vol. 79, pp. 5–7.

6. Chelishchev N.F., Berenshtein V.G., *Klinoptilolit* [Clinoptilolite], VIEMS, Moscow, RU, 1974.

7. Kochkin Iu. N., Vlasenko N. V., "Effect of the acidity spectrum of zeolites of different structural type on their catalytic characteristics in the synthesis reaction of ETBE", *Teoreticheskaia i eksperimental'naia khimiia* [Theoretical and experimental chemistry], 2002, vol. 38, no. 2, pp. 120–124.

8. Eremenko A. M., Sardarly A. M., Neimark I. E., Tel'biz G. M., Galich P. M., "Investigation of the acidity of zeolite-containing catalysts by the method of luminescence spectroscopy", *Teoreticheskaia i eksperimental'naia khimiia* [Theoretical and experimental chemistry], 1977, vol. 13, no. 4, pp. 549–553.

9. “Agrochemistry”, Available at: http://agrohimija.ru/ceolity/2411-harakteristika-sorbcionnoy-sposobnosti-prirodnyh-ceolitov.html, (accessed 07.10.2016).

10. Panasiugin A. S., Tsyganov A. R., Lomonosov V. A., Masherova N. P., “Efficiency of the use of natural minerals in the localization of the effects of radioactive contamination in the course of emerging technogenic catastrophes”, in Chazov O. V., Novikov I. A. (ed.), *Ekologiia i zashchita okruzhaiushchei sredy : sbornik tezisov dokladov III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, Minsk, 19 maia 2016 g.* [Ecology and environmental protection: a collection of abstracts of the III International Scientific and Practical Conference, Minsk, May 19, 2016], Minsk, BY, 2016, pp. 228–230.

11. Soldatov V.S., Sosinovich Z.I., Korshunova T.A., “Rapid potentiometric titration of ion exchangers”, *Doklady Natsional’noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2001, vol. 45, no. 2, pp. 71–74.

12. Nesterenok P. V., Soldatov V. S., “Protolytic properties of aminocarboxyl polyampholites based on the modacrylic polymer matrix”, *Vestsi Natsyianal’nai akademii navuk Belarusi: Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2014, no. 4, pp. 72–79.

13. “Nester”, Available at: http://copoka.by/nester/, (accessed 10.10.2016).

Информация об авторах

Самойленко Оксана Александровна – науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: oksana-230881@tut.by.

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.

Нестеронок Петр Викторович – науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: petr.nester@gmail.com.

Information about the autors

Oxsana A. Samoilenko – Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oksana-230881@tut.by.

Vladimir S. Soldatov – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of 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.

Petr V. Nesteronok – Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: petr.nester@gmail.com.

ISSN 1561-8331(print.)

НЕАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

INORGANIC CHEMISTRY

УДК 620.197.3:620.193:621.357.7

Поступила в редакцию 20.02.2017
Receiver 20.02.2017

М. М. Борзых, Н. Е. Акулич, В. Г. Матыс, Н. П. Иванова, И. Н. Кандидатова, В. А. Ашуйко

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

ИНГИБИТОРНАЯ ЗАЩИТА ОЦИНКОВАННОЙ СТАЛИ ВАНАДАТОМ НАТРИЯ

Аннотация: Описаны результаты исследования способа защиты гальванических цинковых покрытий в нейтральной хлоридсодержащей среде растворимым ингибитором коррозии ванадатом натрия Na_3VO_4. Исследования ингибиторной защиты гальванически оцинкованной стали Na_3VO_4 были проведены весовым и электрохимическим методами. Исследования проводили в 3%-ном растворе хлорида натрия в диапазоне концентраций ингибитора 0,0005–0,0003 М. Были определены массовые показатели коррозии, плотности тока и потенциалы коррозии оцинкованной стали в зависимости от концентрации ингибитора. Электрохимические исследования показывают, что введение в коррозионную среду (3% NaCl) в качестве ингибитора ванадата Na_3VO_4 в количествах 0,00005–0,0003 М замедляет процесс коррозии цинка. Процесс коррозии замедляется в 3,3 раза при концентрации ингибитора 0,00005 М, и в 20 раз при концентрации ингибитора 0,0002 М соответственно. Увеличение концентрации ванадата натрия более 0,0002 М нецелесообразно, так как происходит увеличение тока коррозии. На основании двух независимых методов исследования ингибиторной защиты оцинкованной стали ванадатом Na_3VO_4 можно сделать вывод, что оптимальная концентрация ингибитора коррозии Na_3VO_4 в 3%-ном растворе NaCl лежит в диапазоне 0,0001–0,0002 М. При этом защитный эффект ингибитора, определенный весовым методом, составляет 40–76%, а электрохимическим – 93–95%.

Ключевые слова: ингибиторная защита, цинкование, цинковые покрытия, ванадат натрия

Для цитирования: Ингибиторная защита оцинкованной стали ванадатом натрия / М. М. Борзых [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 22–28.

M. M. Borzyh, N. E. Akulich, V. G. Matys, N. P. Ivanova, I. N. Kandidatova, V. A. Ashuiko

Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus

CORROSION INHIBITION OF Zn-PLATED STEEL BY SODIUM VANADATE

Abstract: The results of investigation of corrosion inhibition of zinc-plated coatings in neutral chloride-containing corrosive medium by aqueous sodium vanadate solution are described. Investigations of corrosion inhibition of zinc-plated coatings on steel were performed by gravimetric and electrochemical method. The corrosive medium was neutral 3% sodium chloride solution, with a sodium vanadate concentration varied from 0.00005 M to 0.0003 M. Mass indices of corrosion, current density and corrosion potential of galvanized steel were determined depending on inhibitor concentration. Electrochemical studies show that the introduction of sodium vanadate in amounts of 0.00005–0.0003 M into the corrosive medium (3% sodium chloride solution) slows down the process of zinc corrosion. The corrosion process slows down by 3.3 times at an inhibitor concentration of 0.00005 M and by 20 times at an inhibitor concentration of 0.0002 M, respectively. An increase in the concentration of sodium vanadate to more than 0.0002 M is inappropriate, since an increase in the corrosion current occurs. The optimal corrosion inhibitor concentration for zinc-plated steel in 3% NaCl solution for Na_3VO_4 lies in the range of 0.0001–0.0002 M. The protection effect of the inhibitor found by gravimetric and electrochemical methods equals to 40–76% and 93–95%, respectively.

Keywords: corrosion inhibition, zinc-plating, zinc coatings, sodium vanadate

For citation: Borzyh M. M., Akulich N. E., Matys V. G., Ivanova N. P., Kandidatova I. N., Ashuiko V. A. Corrosion inhibition of Zn-plated steel by sodium vanadate. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 22–28 (In Russian).

Введение. Основное назначение цинковых покрытий – защита углеродистой и низколегированной стали от коррозии. Длительность защиты покрываемых изделий от коррозионного разрушения определяется коррозионной стойкостью самих покрытий. Вопросам повышения коррозионной стойкости цинковых покрытий в последнее время уделяется повышенное внимание со стороны разработчиков и потребителей процессов цинкования. При использовании оцинко-

ванных изделий в замкнутых коррозионных средах необходима ингибиторная защита. Для ингибиторной защиты алюминиевых сплавов используются ванадаты. При этом для цинксодержащих сплавов алюминия (таких как АА7075) актуально исследование ингибиторной защиты цинка, который является коррозионно нестойким компонентом таких сплавов [1, 2]. Ванадийсодержащие конверсионные покрытия на цинке исследовались ранее как альтернатива хроматным пассивационным покрытиям для гальванических цинковых покрытий [3]. При этом механизм ингибирующего действия ванадатов на цинк еще недостаточно выяснен. В работе [1] отмечается, что ванадаты замедляют как катодную реакцию восстановления кислорода, так и анодную реакцию растворения цинка в 0,1 М NaCl. При длительной выдержке цинка в растворе NaCl в присутствии $NaVO_3$ на поверхности возможно образование адсорбированных поливанадатов, в то время как при недлительной выдержке происходит стабилизация пассивационных пленок состава $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$, формируемых на поверхности цинка в водном растворе NaCl [1]. Исследования пассивационных пленок, полученных на поверхности цинка из ванадатных растворов, методом электронно-зондового энергодисперсного локального химического анализа указывают на содержание в их составе оксидов ванадия V_2O_5, VO_2 или их гидратов $V_2O_5 \cdot nH_2O$ и $VO(OH)_2$ [2].

Цель работы – исследование ингибиторной защиты гальванических цинковых покрытий в нейтральной хлоридсодержащей среде ванадатом натрия Na_3VO_4 весовым и электрохимическим методами.

Методика эксперимента. Объектами исследования служили гальванические цинковые покрытия на углеродистой стали 08кп. Цинковые покрытия наносили электрохимическим способом на зачищенные наждачной бумагой и обезжиренные ацетоном стальные пластины из листовой углеродистой стали марки 08кп размером 20×20 мм. Для осаждения покрытий использовали процесс слабокислого цинкования ЛГ–50 [4]. Состав используемого электролита (рабочий диапазон значений pH 5,0–5,5): $ZnCl_2$ (80 г/л), NH_4Cl (205 г/л), блескообразователь «ЛГ–50А» (40 г/л), блескообразователь «ЛГ–50Б» (0,85 г/л).

Процесс осаждения цинка проводили при температуре 21±2°С с цинковыми анодами марки Ц0. Покрытия наносили при плотности тока 2 А/дм^2 в один слой толщинами 9 мкм для снятия поляризационных кривых и 18 мкм для определения массового показателя коррозии. Пассивацию цинковых покрытий не проводили.

Коррозионные испытания проводили в 3%-ном растворе NaCl в присутствии ванадата натрия с концентрацией $(0{,}5–3)\times10^{-4}$ М. Водородный показатель pH этих растворов находился в пределах 7,5–7,7 (pH доводили с требуемого значения с помощью HCl). Ингибитор коррозии Na_3VO_4 синтезировали с применением 20%-ного раствора NaOH и V_2O_5. Для приготовления 0,1 М раствора ванадата Na_3VO_4 навеску оксида V_2O_5 массой 1,82 г растворили в 100 мл 20%-ного раствора NaOH. Полученный раствор ингибитора использовали в качестве исходного при приготовлении рабочих растворов для исследования ингибиторной защиты.

Коррозионные испытания весовым методом проводили в течение 24–96 ч. Для определения потерь массы образцы взвешивали на аналитических весах марки Ohaus PA 13 C с точностью ±0,001 г. Для определения массового показателя коррозии предварительно взвешенные образцы оцинкованной стали (4 шт.) с толщиной покрытия 18 мкм погружали на подвесках в химические стаканы с 3%-ным раствором NaCl, содержащим ингибитор. Каждые 24 ч один образец извлекали из раствора, промывали водой и удаляли продукты коррозии в растворе $(NH_4)_2S_2O_8$ с концентрацией 100 г/л в течение 5 мин при комнатной температуре [5]. Затем образец снова промывали водой, сушили фильтровальной бумагой и на воздухе в течение 5–10 мин и взвешивали. Массовый показатель коррозии K_m (г·м$^{-2}$·ч$^{-1}$) рассчитывали на основе изменения массы образца по формуле:

$$K_m = \Delta m / S \cdot \tau, \quad (1)$$

где Δm – изменение массы образца, г; S – площадь поверхности коррозии, м^2; τ – время испытаний, ч. В ходе испытаний измеряли также стационарный потенциал оцинкованных образцов относительно хлорсеребряного электрода сравнения.

Коррозионную стойкость цинковых покрытий исследовали также электрохимическим методом путем снятия анодных и катодных поляризационных кривых с использованием потенциостата IPC-PRO M, подключенного к персональному компьютеру с программным обеспечением «IPC2000». Потенциостатические поляризационные кривые снимали в стандартной трехэлектродной электрохимической ячейке ЯСЭ-2 с платиновым вспомогательным электродом и хлорсеребряным электродом сравнения. После погружения образца в раствор его выдерживали в течение 5–7 мин для определения величины бестокового потенциала. После установления потенциала снимали катодную поляризационную кривую в потенциодинамическом режиме со скоростью развертки потенциала 1 мВ/с. При этом потенциал смещали на 200±50 мВ от бестокового потенциала в катодную сторону. Далее образец находился в растворе до установления значения бестокового потенциала, после чего снимали анодную кривую со смещением на +100 мВ от бестокового потенциала в анодную сторону. Для каждого опыта использовали свежий раствор. Число параллельных опытов составляло 2–4.

На основании массового показателя коррозии и плотности тока коррозии были рассчитаны значения защитного эффекта ингибитора Z:

$$Z = (K_{м,0} - K_м) / K_{м,0} = (i_{кор,0} - i_{кор}) / i_{кор,0}, \quad (2)$$

где $K_{м,0}$ и $K_м$ – скорость растворения металла в среде без ингибитора и с ингибитором соответственно, г/(м^2·ч); $i_{кор,0}$ и $i_{кор}$ – плотность тока коррозии металла в среде без ингибитора и с ингибитором соответственно, мкА/см^2.

Результаты и их обсуждение. Были получены фотографии исходного образца и образцов после проведения коррозионных испытаний в течение 96 ч в 3%-ном растворе NaCl без и с добавлением ванадата натрия различной концентрации. Осмотр образцов показал, что уже после 24 ч испытаний на поверхности покрытия образуются темно-серые и белые точечные скопления, полосы и разводы продуктов коррозии цинка (так называемая «белая коррозия»). С течением времени площадь, занимаемая ими, увеличивалась. Наименьшие коррозионные повреждения после 96 ч испытаний отмечались при концентрациях ванадата Na_3VO_4 0,0001 М и 0,0002 М, в то время как при концентрации 0,0003 М коррозионные повреждения были даже более сильными, чем в отсутствие ингибитора.

В 3%-ном растворе NaCl величина электродного потенциала цинка принимает значение ~ 1 В относительно насыщенного хлорсеребряного электрода. На временных зависимостях потенциала при всех исследованных концентрациях ингибитора достаточно четко прослеживается минимум при значении времени после начала испытаний 20–30 ч (рис. 1, *а*). При этом стационарный потенциал образцов снижается на ~ 25–30 мВ. Снижение стационарного потенциала цинка в первые часы воздействия 0,1 М раствора NaCl с добавкой 0,0025 М $NaVO_3$ ранее отмечалось в работе [1]. Смещение стационарного потенциала в катодную сторону можно связать с активацией поверхности в первые 30 ч коррозионных испытаний. Далее потенциал постепенно смещается в анодную область и после 96 ч коррозионных испытаний оказывается на 10–50 мВ более положительным, чем в начале испытаний. Смещение потенциала образцов в анодную область может быть связано с пассивацией поверхности. Таким образом, после 96 ч испытаний на поверхности цинка начинают преобладать процессы, приводящие к пассивации поверхности, в результате чего потенциал смещается в анодную область.

На рис. 1, *б* представлена временная зависимость весового показателя коррозии цинкового покрытия в 3%-ном растворе NaCl без и с ингибитором коррозии Na_3VO_4. После 55–60 ч испытаний значение весового показателя коррозии в коррозионной среде, содержащей 0,00005 М и 0,0003 М Na_3VO_4, становится больше, чем в среде без ингибитора, который в данном случае может являться активатором поверхности.

На рис. 2 представлена зависимость весового показателя коррозии цинка от концентрации ингибитора в коррозионной среде. Из данной зависимости можно сделать вывод, что оптимальная концентрация ингибитора Na_3VO_4 составляет 0,0001–0,0002 М.

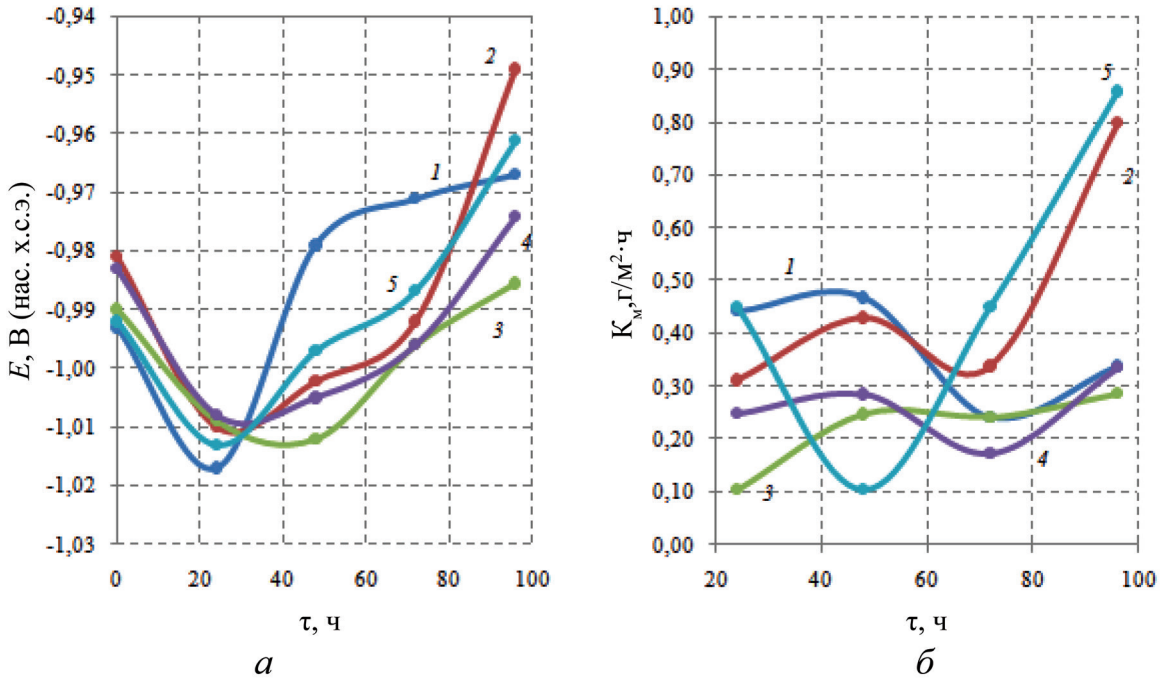


Рис. 1. Временная зависимость потенциала оцинкованной стали (*а*) и массового показателя коррозии цинкового покрытия (*б*) в растворе 3% NaCl без ингибитора (*1*) и с ингибитором Na_3VO_4 (*2–5*) в различных концентрациях: *2* – 0,00005 М; *3* – 0,0001 М; *4* – 0,0002 М; *5* – 0,0003 М

Fig. 1. Potential of zinc-plated steel *(a)* and gravimetric corrosion coefficient of zinc coating *(б)* versus time in 3% NaCl solution without inhibitor (*1*) and in presence of Na_3VO_4 inhibitor at different concentrations (*2–5*): *2* – 0.00005 M; *3* – 0.0001 M; *4* – 0.0002 M; *5* – 0.0003 M

Анализ значений показателя коррозии (рис. 2) в зависимости от концентрации Na_3VO_4 и времени испытаний позволил сделать следующие выводы: с увеличением времени испытаний более 70 ч скорость коррозии возрастает как в присутствии ингибитора, так и без него; наименьшая скорость коррозии и наибольший защитный эффект ингибитора отмечался при концентрациях ванадата натрия Na_3VO_4 0,0001 и 0,0002 М; при концентрациях Na_3VO_4 0,00005 и 0,0003 М и длительном времени испытаний 72 и 96 ч скорость коррозии увеличивается.

На рис. 3 показаны поляризационные кривые в 3%-ном растворе NaCl без ингибитора и с ингибитором Na_3VO_4. Ток и потенциал коррозии определяли по пересечению прямолинейных участков тафелевских поляризационных кривых, которые при необходимости экстраполировали. Определенные таким образом значения потенциалов и плотностей тока коррозии усредняли по результатам параллельных опытов. Средние значения представлены в табл. 1.

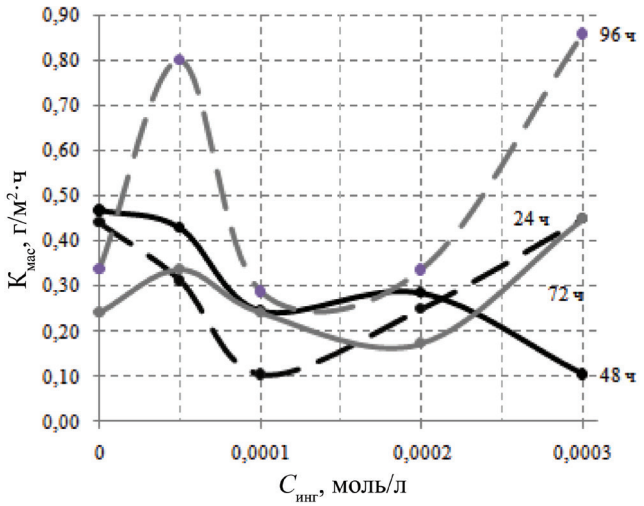


Рис. 2. Зависимость весового показателя коррозии от концентрации ингибитора в 3%-ном растворе NaCl при 24 ч, 48, 72 и 96 ч испытаний

Fig. 2. Gravimetric corrosion coefficient versus inhibitor concentration in 3% NaCl solution after 24 h, 48, 72 and 96 h of testing

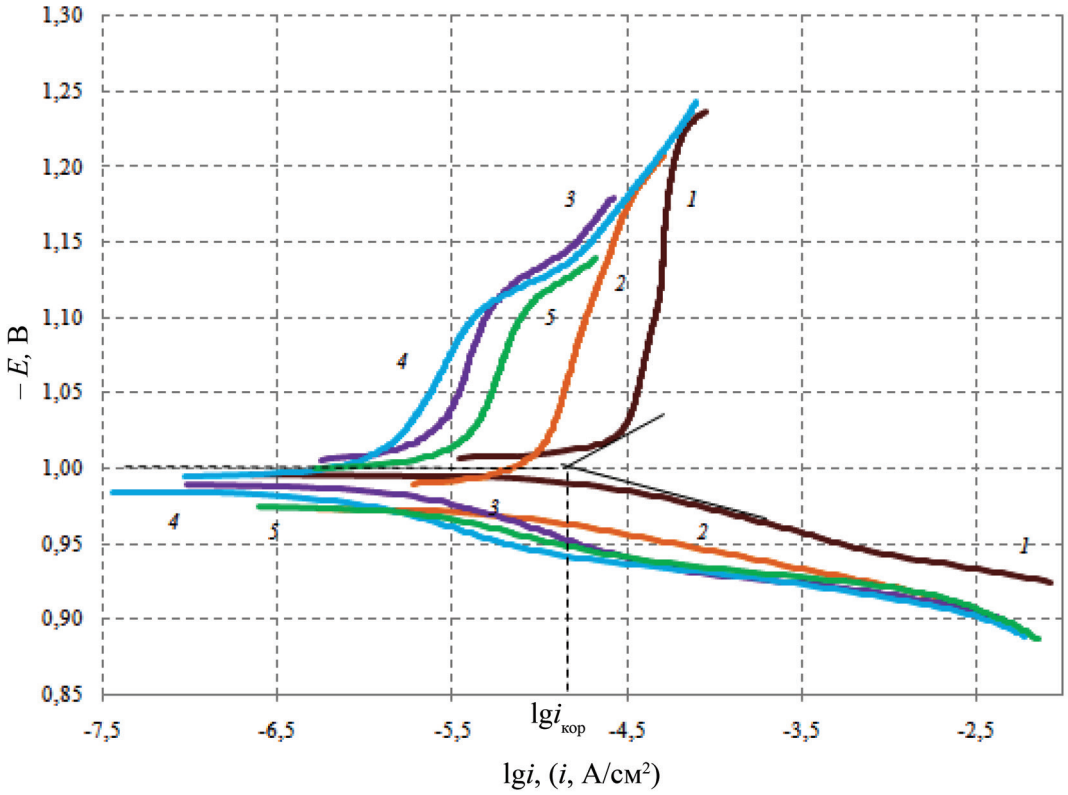


Рис. 3. Поляризационные кривые в 3%-ном растворе NaCl без (*1*) и с ингибитором Na_3VO_4 (*2–5*) в различных концентрациях: 2 – 0,00005 М; 3 – 0,0001 М; 4 – 0,0002 М; 5 – 0,0003 М

Fig. 3. Polarization curves in 3% NaCl solution without inhibitor (*1*) and in presence of Na_3VO_4 inhibitor at different concentrations (*2–5*): *2* – 0.00005 M; *3* – 0.0001 M; *4* – 0.0002 M; *5* – 0.0003 M

Таблица 1. **Значения потенциала $E_{кор}$ и тока коррозии $i_{кор}$ цинкового покрытия в зависимости от состава раствора**

Table 1. **Corrosion potential E_{cor} and corrosion current i_{cor} of zinc-plated coating depending on the solution composition**

Состав раствора	$E_{кор}$, В	$i_{кор}$, мкА/см^2
3%-ный NaCl	–1,00	10,77
3%-ный NaCl + 0,00005 М Na_3VO_4	–0,98	3,27
3%-ный NaCl + 0,0001 М Na_3VO_4	–0,99	0,70
3%-ный NaCl + 0,0002 М Na_3VO_4	–0,99	0,53
3%-ный NaCl + 0,0003 М Na_3VO_4	–0,98	0,73

С введением в 3%-ный раствор NaCl ванадата Na_3VO_4 коррозионный потенциал цинка изменяется незначительно, сдвигаясь в электроположительную сторону на ~ 20 мВ.

На рис. 4 показана зависимость тока коррозии цинковых покрытий в 3%-ном растворе NaCl, содержащем ингибитор коррозии Na_3VO_4. Электрохимический метод четко показывает защитный эффект ванадата натрия при всех концентрациях. Плотность тока коррозии характеризует начальную скорость коррозии и потому качественно согласуется с характером изменения массового показателя коррозии при самом малом времени испытаний, которое составляло 24 ч (рис. 1, *б*). Защитный эффект ингибитора, определенный по токам коррозии, составляет более 90% (табл. 2) при концентрациях Na_3VO_4 0,0001 М и более, в то время как рассчитанный на основании весовых измерений максимальный защитный эффект наблюдался при концентрации ингибитора 0,0001 М и времени испытаний 24 ч и составлял ~75%.

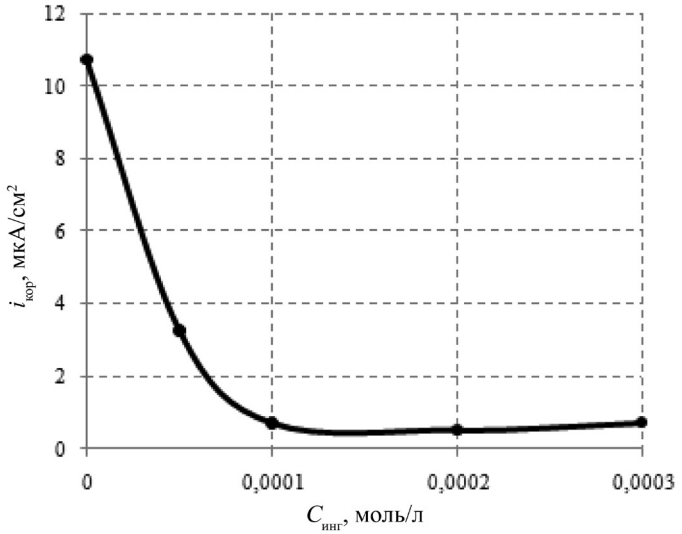


Рис. 4. Зависимость тока коррозии цинковых покрытий в 3%-ном растворе NaCl, содержащем ингибитор коррозии Na_3VO_4

Fig. 4. Corrosion currents of zinc coatings in 3% NaCl solution containig Na_3VO_4 corrosion inhibitor

Таблица 2. **Показатели коррозии оцинкованной стали и защитный эффект *Z* ингибитора Na_3VO_4 в 3%-ном растворе NaCl**

Table 2. **Corrosion coefficients of zinc-plated steel and protection effect Z of Na_3VO_4 inhibitor in 3% NaCl solution**

Содержание Na_3VO_4, моль/л	Весовой метод (24 ч)		Электрохимический метод	
	$K_м$, г/(м^2·ч)	*Z*, %	$i_{кор}$, мкА/см^2	*Z*, %
0,00005	0,31	29,4	3,27	69,7
0,0001	0,10	76,5	0,70	93,5
0,0002	0,26	41,2	0,53	95,1
0,0003	0,42	5,88	0,73	93,2

Таким образом, электрохимические исследования показывают, что при введении в коррозионную среду (3%-ный NaCl) в качестве ингибитора ванадата Na_3VO_4 в количествах 0,00005–0,0003 М процесс коррозии цинка замедляется в 3,3 раза при концентрации 0,00005 М, в 20 раз при концентрации 0,0002 М. Увеличение концентрации ингибитора ванадата натрия более 0,0002 М нецелесообразно, так как происходит увеличение тока коррозии.

На основании двух независимых методов исследования ингибиторной защиты цинка можно сделать вывод, что оптимальная концентрация ингибитора коррозии Na_3VO_4 в 3%-ном растворе NaCl составляет 0,0002 М.

Заключение. Проведены исследования ингибиторной защиты гальванически оцинкованной стали растворимым ингибитором Na_3VO_4 весовым и электрохимическим методами в 3%-ном растворе NaCl в диапазоне концентраций ингибитора 0,0005–0,0003 М. Определены массовые показатели коррозии, плотности тока и потенциалы коррозии оцинкованной стали в зависимости от концентрации ингибитора.

На основании двух независимых методов исследования ингибиторной защиты оцинкованной стали ванадатом Na_3VO_4 можно сделать вывод, что оптимальная концентрация ингибитора коррозии Na_3VO_4 в 3%-ном растворе NaCl лежит в диапазоне 0,0001–0,0002 М. При этом защитный эффект ингибитора, определенный весовым методом, составляет 40–76%, а электрохимическим – 93–95%.

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. Hurley, B. L. Corrosion Inhibition of Zinc by Aqueous Vanadate Species / / B. L. Hurley, K. D. Ralston, R. G. Buchheita / J. Electrochem. Soc. – 2014. – Vol. 161, N10. – P. C471–C475.

2. Li, Ning Corrosion protection properties of vanadium films formed on zinc surfaces / Ning Li / Rare Metals. – 2011. – Vol. 30, N 2. – P. 146.

3. Zou, Zhongli. A vanadium-based conversion coating as chromate replacement for electrogalvanized steel substrates / Zhongli Zou, Ning Li, Deyu Li, Haiping Liu, Songlin Mu / J. All. Compd. – 2011. – Vol. 509. – P. 503–507.

4. Процесс слабокислого цинкования – chimsn.ru [Электронный ресурс]. ООО «Химсинтез». 2014. URL: http://chimsn.ru/bleskoobrazovateli-dlya-galvanotehniki/process-slabokislogo-cinkovaniya/ (дата обращения: 25.09.2016).

5. ГОСТ Р 9.907-2007. Единая система защиты от коррозии и старения. Металлы, сплавы, покрытия металлические. Методы удаления продуктов коррозии после коррозионных испытаний. [Текст]. – Введ. 2009–01–01. – М. : Стандартинформ, 2007. – 16 с.

References

1. Hurley B. L., Ralston K. D., Buchheita R. G., “Corrosion Inhibition of Zinc by Aqueous Vanadate Species”, *Journal of The Electrochemical Society*, 2014, vol. 161, no. 10, pp. C471–C475.

2. Li Ning, “Corrosion protection properties of vanadium films formed on zinc surfaces”, *Rare Metals*, 2011, vol. 30, no. 2, p. 146.

3. Zou Zhongli, Li Ning, Li Deyu, Liu Haiping, Mu Songlin, “A vanadium-based conversion coating as chromate replacement for electrogalvanized steel substrates”, *Journal of Alloys and Compounds*, 2011, vol. 509, pp. 503–507.

4. “The process of weak acid zinc plating”, 2014, available at: http://chimsn.ru/bleskoobrazovateli-dlya-galvanotehniki/process-slabokislogo-cinkovaniya/, (Accessed 25.09.2016).

5. Limited Liability Company “Protector”, Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry im. Frumkin Russian Academy of Sciences, *GOST R 9.907-2007. Edinaia sistema zashchity ot korrozii i stareniia. Metally, splavy, pokrytiia metallicheskie. Metody udaleniia produktov korrozii posle korrozionnykh ispytanii* [GOST R 9.907-2007. Unified system of protection against corrosion and aging. Metals, alloys, metal coatings. Methods for removing corrosion products after corrosion testing], Standartinform, Moscow, RU, 2007.

Информация об авторах

Борзых Мария Михайловна – выпускница, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220050, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vmatys@belstu.by.

Акулич Надежда Евгеньевна – магистр техн. наук, аспирант, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220050, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zhpk.n@yandex.ru.

Матыс Владимир Генрихович – канд. хим. наук, доцент, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220050, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vmatys@belstu.by.

Иванова Наталья Петровна – канд. хим. наук, доцент, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220050, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ivanova@belstu.by.

Кандидатова Ирина Николаевна – канд. хим. наук, ассистент, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220050, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kandidatova@belstu.by.

Ашуйко Валерий Аркадьевич – канд. хим. наук, доцент, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220050, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ashuiko@belstu.by.

Information about the authors

Mariya M. Borzyh – Graduate, Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vmatys@belstu.by.

Nadejda E. Akulich – M. Sc. (Engineering), Ph. D. student, Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zhpk.n@yandex.ru.

Vladimir G. Matys – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vmatys@belstu.by.

Natal’ya P. Ivanova – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ivanova@belstu.by.

Irina N. Kandidatova – Ph. D. (Chemistry), Assistant Lecturer, Belarusian State Technological University (13a Sverdlov Str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kandidatova@belstu.by.

Valerii A. Ashuiko – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ashuiko@belstu.by.

ISSN 1561-8331(print.)

КАЛОІДНАЯ ХІМІЯ

COLLOIDAL CHEMISTRY

УДК 544.77

Поступила в редакцию 23.12.2016
Received 23.12.2016

О. Н. Опанасенко, Н. В. Яковец, Н. П. Крутько

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

ПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА АНИОННО-ОРИЕНТИРОВАННЫХ ЦВИТТЕР-ИОННЫХ ПАВ НА ОСНОВЕ АМИНОВ И КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Аннотация: Получены композиции поверхностно-активных веществ на основе карбоновых кислот и алифатических аминов, отличающихся количеством аминогрупп в цепи и длиной углеводородного радикала, с использованием методологии «зеленой химии» путем реализации принципа мультикомпонентных реакций. Используя метод ИК-спектроскопии, установлена информация об основных функциональных группах и структуре объектов исследования: эпоксидированного рапсового масла, являющегося одним из источников органических кислот в композициях, и синтезированных анионно-ориентированных цвиттер-ионных ПАВ. По результатам изучения поверхностного натяжения методом отрыва кольца (Дю-Нуи) на межфазной границе раствор–воздух построены изотермы водных растворов ПАВ в щелочной среде, определены их коллоидно-химические свойства: поверхностное натяжение при достижении критической концентрации мицеллообразования, свободная энергия адсорбции Гиббса, поверхностная активность, гидрофильно-липофильный баланс. Показано, что все исследуемые поверхностно-активные композиции эффективно понижают поверхностное натяжение (вплоть до 25,2 мН/м), с ростом степени гидрофобности в гомологическом ряду аминов за счет увеличения длины углеводородного радикала уменьшаются критическая концентрация мицеллобразования и значения гидрофильно-липофильного баланса, а также увеличивается абсолютное значение стандартной свободной энергии адсорбции. Высокие значения гидрофильно-липофильного баланса для исследуемых ПАВ (16÷22) свидетельствуют о возможности их применения в качестве эффективных эмульгаторов при получении эмульсий I рода (масло/вода) и пенообразователей. Оценена пенообразующая способность ПАВ на основе пентаэтиленгексамина и олеиновой кислоты.

Ключевые слова: цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества, поверхностное натяжение, адсорбция, гидрофильно-липофильный баланс, ИК-спектроскопия, пенообразующая способность

Для цитирования: Опанасенко, О. Н. Поверхностные свойства анионно-ориентированных цвиттер-ионных ПАВ на основе аминов и карбоновых кислот / О. Н. Опанасенко, Н. В. Яковец, Н. П. Крутько // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 29–37.

O. N. Opanasenko, N. V. Yakavets, N. P. Krut'ko

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

SURFACE PROPERTIES OF ANIONICALLY-ORIENTED ZWITTERIONIC SURFACTANTS BASED ON AMINES AND CARBOXYLIC ACIDS

Abstract: The compositions of surfactants based on carboxylic acids and aliphatic amines with a different number of amino groups in the chain and the length of the hydrocarbon radical were obtained using the methodology of "green chemistry" by realization of the principle of multicomponent reactions. The information about the basic functional groups and structure of the objects of study: epoxidated rapeseed oil, which is one of the sources of organic acids in the compositions, and anionically-oriented synthesized zwitterionic surfactants, was obtained using IR-spectroscopy. Based on the results of surface tension at the solution - air interface measuring by du Noüy ring method, the isotherms of surfactant aqueous solutions in an alkaline medium were plotted and the colloid-chemical properties, such as surface tension of the surfactant aqueous solution under the critical micelle concentration, the Gibbs free energy of adsorption, the surface activity and the hydrophilic-lipophilic balance, were defined. All investigated surfactant compositions were shown to reduce effectively the surface tension (up to 25.2 mN/m), while the critical micelle concentration and the hydrophilic-lipophilic balance decrease with the increase of hydrophobicity degree in the amine homologous series due to the increase of the length of the hydrocarbon radical. The absolute value of the standard free energy of adsorption increases with the increase

© Опанасенко О. Н., Яковец Н. В., Крутько Н. П., 2017

of hydrophobicity degree. The high values of hydrophilic-lipophilic balance for the investigated surfactants (16 ÷ 22) make it possible to use them as effective emulsifiers for preparation of type I (oil / water) emulsions and foaming agents. The foaming capacity of the surfactant based on oleic acid and pentaethylenehexamine was estimated as well.

Keywords: zwitterionic surfactants, surface tension, adsorption, hydrophilic-lipophilic balance, infrared spectroscopy, foaming capacity

For citation: Opanasenko O. N., Yakavets N. V., Krut'ko N. P. Surface properties of anionically-oriented zwitterionic surfactants based on amines and carboxylic acids. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 29–37 (In Russian).

В настоящее время поверхностно-активные вещества (ПАВ) применяются в различных областях промышленности – это моющие средства, флотореагенты, стабилизаторы эмульсий и пен, диспергаторы минералов, антистатики и т.д. Широкое применение ПАВ обусловлено их способностью при низких концентрациях значительно интенсифицировать технологические процессы, модифицировать поверхности, придавая им необходимые свойства, что позволяет значительно снизить себестоимость продукции.

В последнее десятилетие все возрастающие требования к защите окружающей среды и высокие темпы роста потребления нефти обусловили рост интереса к натуральным возобновляемым источникам сырья для получения различных органических соединений и материалов. Это послужило основой для создания и развития нового направления для производства более безопасных химических реагентов, которое получило название «зеленая химия». Одним из интересных направлений в «зеленом» органическом синтезе является проведение мультикомпонентных реакций, в которых два вещества и более смешиваются одновременно в одном реакторе и в результате каскада элементарных реакций непосредственно превращают их в конечный продукт без образования или выделения побочных продуктов [1].

Особенно важной является разработка с точки зрения «зеленой химии» новых поверхностно-активных реагентов: деэмульгаторов, ингибиторов коррозии, биоцидов, которые необходимы в процессах нефтепромысла для транспортировки, диспергирования и сбора нефти [2]. Перспективными соединениями в данном направлении выступают ПАВ на основе амидоиминов, амидов и эфиров длинноцепочечных жирных кислот [3–7]. Кроме того, актуальна разработка амфотерных (цвиттер-ионных) ПАВ, отличающихся биполярной структурой, которые при растворении в воде способны быть носителями как положительного, так и отрицательного заряда (в зависимости от pH). Примером таких ПАВ служат алкилбетаины, алкилсульфобетаины и производные имидазолина и др. [8]. Известно, что основными преимуществами амфотерных ПАВ являются хорошие санитарно-гигиенические свойства (низкая токсичность, слабое раздражающее действие на кожу, высокая биоразлагаемость), высокие антистатические свойства, они хорошо совмещаются в композициях с другими ПАВ и обладают слабым бактерицидным действием [9].

В данной работе объектами исследования служили композиции поверхностно-активных веществ, в состав которых входят олеиновая кислота (**ОК**) $CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$ и амины различного химического строения: гомологи – этилендиамин (**ЭДА**) $H_2N\text{-}C_2H_4\text{-}NH_2$, диэтилентриамин (**ДЭТА**) $H_2N\text{-}(C_2H_4\text{-}NH)_2\text{-}H$, триэтилентетрамин **(ТЭТА)** $H_2N\text{-}(C_2H_4\text{-}NH)_3\text{-}H$, тетраэтиленпентамин **(ТЭПА)** $H_2N\text{-}(C_2H_4\text{-}NH)_4\text{-}H$, пентаэтиленгексамин **(ПЭГА)** $H_2N\text{-}(C_2H_4\text{-}NH)_5\text{-}H$, и промышленная смесь «Амин-1000» **(А-1000)**. Их физико-химические свойства приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. **Физико-химические свойства олеиновой кислоты (производство STANLUX ltd.)**

Table 1. **Physicochemical properties of oleic acid (by STANLUX ltd.)**

Наименование показателей	Значение
Йодное число, г I/100 г	99,3
Кислотное число, мг KOH/ г	196,6
Число омыления, мг KOH/ г	198,0
Температура застывания, ºС, не более	8,5
Массовая доля влаги, %, не более	0,2
Неомыляемые вещества, max. %, не более	0,84
Молекулярная масса	282,47

Таблица 2. **Физико-химические свойства аминов (производства Delamine и BASF)**

Table 2. **Physicochemical properties of amines (by Delamine and BASF)**

Название амина	ЭДА	ДЭТА	ТЭТА	ТЭПА	ПЭГА	А-1000
Содержание амина, мас. %	99,5	99,0	96	96	70	состав: аминоэтаноламин – 20,1; высшие полиамины – 59,7; ТЭТА – 19,6
Содержание воды, мас. %	<0,15		<0,1			–
Внешний вид	Прозрачный раствор					Черная жидкость
Плотность при 20 ºС	0,898	0,952	0,980	0,994	1,002	1,040
Температура кипения при 101,3 кПа, ºС	117	207	277	320	–	236-310
Температура застывания, ºС	10,8	–39	–35	–30	–26	–
Общее содержание азота, мас. %	46,6	40,7	36	35	34	–
Вязкость при 20 ºС, мПа*с	2,0	7,7	31	80	≈ 200	–
Аминное число, мг КОН/г	1870	–	1440	1350	1220	1134
Молекулярная масса	60	103	146	189	232	–

Более высокомолекулярные композиции ПАВ получали с использованием, кроме **ОК,** эпоксидированного рапсового масла (**ЭРМ**), физико-химические характеристики которого представлены в табл. 3. В его составе присутствуют следующие органические кислоты, мас. %: пальмитиновая – 5; стеариновая – 1; олеиновая – 56; линолевая – 19; α-линолевая – 19 и эруковая – 5.

ИК-спектр, позволяющий идентифицировать функциональные группы в составе ЭРМ и судить о его строении, приведен на рис. 1.

Таблица 3. **Физико-химические характеристики ЭРМ производства ОДО «Химавтодорсервис» (Беларусь)**

Table 3. **Physicochemical properties of EpRO produced by SLC Himavtodorservice, Belarus**

Показатель	Способ определения	Значение
Эпоксидное число, %	ГОСТ 12497-93 [10] (потенциометрическое титрование)	4,7
Эпоксидный эквивалент, г/моль		907
Кислотное число, мг КОН/г	ГОСТ 5476-80 [11] (потенциометрическое титрование)	6,9
Кислотность по олеиновой кислоте, %		3,5
Плотность при 30 °С, кг/м^3	«Процессор Тензиометр К100 МК2»	914
Поверхностное натяжение при 30 °С, мН/м		32,1

На спектре ЭРМ (рис. 1) наличие алифатических цепочек фиксируется по деформационным (723, 1377, 1464 см$^{-1}$) и валентным колебаниям (2854, 2926 и 3007 см$^{-1}$) углеводородных групп –CH, –CH_2– и –CH_3. Также обнаружены полосы поглощения, которым соответствуют валентные колебания –C–O– (1097, 1165 см$^{-1}$) и –C=O (1746 см$^{-1}$) групп, характерных для эфиров карбоновых кислот, и полоса 1239 см$^{-1}$, свидетельствующая о валентных колебаниях –C–O–C– фрагмента эпоксидной группы [12, 13].

В результате протекания мультикомпонентной реакции аминирования ОК и ЭРМ происходит образование композиций аминопроизводных (аммониевых солей или амидов) жирных кислот, воды и свободного глицерина, представляющих собой гелеобразные прозрачные продукты янтарного или желто-коричневого цвета. Наличие в составе этих композиций разного количества аминогрупп и увеличивающаяся длина углеводородного радикала будут отражаться на коллоидно-химических свойствах данных ПАВ.

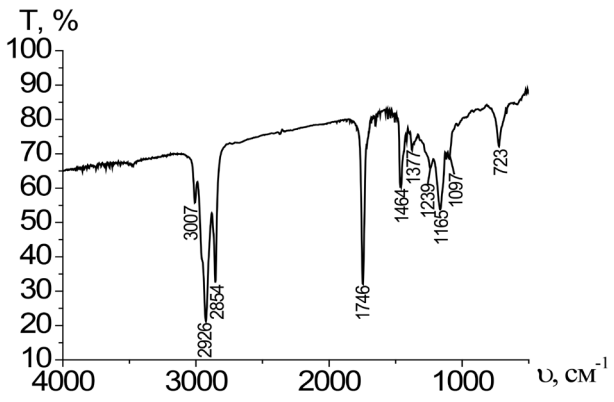


Рис. 1. ИК-спектр ЭРМ

Fig. 1. Infrared spectrum of epoxidated rapeseed oil (EpRO)

Для изучения коллоидно-химических свойств полученных композиций ПАВ готовили их разбавленные растворы (начальная концентрация 1 г/л) в присутствии избытка электролита – NaOH. Для композиций состава ОК+(амин+ЭРМ), характеризующихся более низкой растворимостью в воде, чем ОК+амин, для приготовления истинных растворов предварительно к навеске ПАВ добавляли 1,6 мас. % изопропилового спирта, который выступал в качестве гидротропа [14]. Затем в колбу добавляли дистиллированную воду, подщелоченную до pH 11,5, чтобы исключить влияние гидролиза на точность измерения разбавленных растворов.

Цель работы – изучить поверхностное натяжение и коллоидно-химические характеристики для синтезированных ПАВ и оценить влияние количества аминогрупп и длины углеводородного радикала в структуре ПАВ на их свойства.

Методы исследования. 1. Метод ИК-спектроскопии применяли для получения информации об основных функциональных группах и структуре ЭРМ и полученных ПАВ. Исследования проведены при 20±1 °С в диапазоне 4000–450 $см^{-1}$ с разрешением 4 $см^{-1}$ на ИК-спектрометре М 2000 с Фурье-преобразователем FTIR SPECTROMETER (MIDAC, США). Образцы готовили путем нанесения жидкого образца тонким слоем на пластину KRS.

2. Измерения поверхностного натяжения растворов ПАВ проводили при pH 11,5 на границе раздела раствор/воздух в изотермических условиях при 30±0,5 ºС полустатическим методом отрыва кольца (радиус кольца 9,544 мм, радиус сечения проволоки 0,185 мм) на полностью автоматическом приборе «Процессор Тензиометр К100 МК 2» производства KRÜSS GmbH (Германия) на базе программного обеспечения LabDesk™. Точность измерения составляла ± 1×10^{-5} г. Поверхностное натяжение на границе раздела раствор/воздух было рассчитано по формуле:

$$\sigma = \frac{F_{\max} - F_V}{L \cdot \cos\theta}, \tag{1}$$

где σ – поверхностное натяжение жидкости, мН/м; $F_{\max}$ – максимальная сила, мН; F_V – сила, учитывающая вес поднимаемой жидкости, мН; L – длина смачивания, м; θ – угол смачивания, град [15].

По результатам тензиометрических измерений после построения изотерм поверхностного натяжения были определены коллоидно-химические характеристики ПАВ [16]: поверхностное натяжение водного раствора ПАВ при ККМ ($\sigma_{ККМ}$), критическая концентрация мицеллообразования (*С*ккм), свободная энергия адсорбции Гиббса (*G*), поверхностная активность (*g*), гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ).

Критические концентрации мицеллообразования (ККМ) найдены как точки максимальной кривизны на зависимости $\sigma = f(\lg C)$. Стандартную свободную энергию адсорбции на границе раствор–воздух рассчитывали, согласно [15]:

$$G = RT \ln \frac{C_{ККМ}}{M}, \tag{2}$$

где M – молярность растворителя (в случае воды M = 55,5 моль/л).

Величина ГЛБ является мерой сбалансированности полярной и неполярной частей молекулы, т. е. гидрофильных и гидрофобных свойств ПАВ. ГЛБ исследуемых ПАВ рассчитывали с использованием критических концентраций мицеллообразования [17] в соответствии с уравнением

$$\ln C_{ККМ} = -16{,}33 + 0{,}718\ \text{ГЛБ}. \tag{3}$$

Поверхностную активность *g* определяли по уравнению [18]:

$$g = \lim_{C \to 0}\left(\frac{d\sigma}{dC}\right). \tag{4}$$

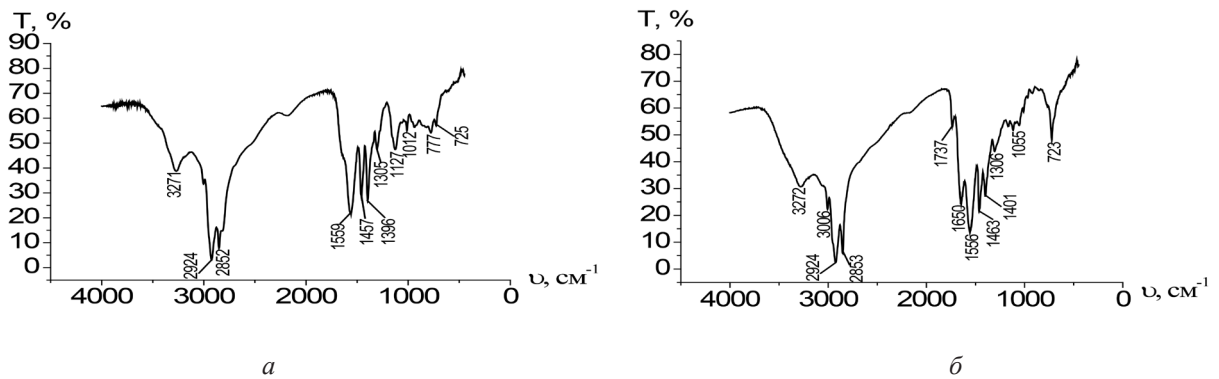
3. Оценка пенообразующей способности ПАВ (ОК+ПЭГА) заключалась в определении высоты в стеклянном цилиндре столба пены, полученной из определенного количества реагента (100 мл), согласно методике [9] с помощью механического диспергирования (барботажа) воздуха при

20 °С через пористую керамическую насадку, погруженную в жидкость при помощи микрокомпрессора Air pump AC-1000 (производства Resun®), который обеспечивал давление 0,024 МПа, скорость подачи воздуха – (94±5) $см^3$/мин, время его пропускания – 60 с. Концентрация растворов ПАВ составляла $3{,}12\times10^{-2} \div 3$ мас. %, а их температура – 45 °С и pH 11–12. Качество полученных пен охарактеризовано их кратностью (отношение объема пены к объему раствора, израсходованного на образование пены) и стабильностью (временем жизни столба пены).

Результаты и их обсуждение. На основании анализа ИК-спектров для полученных ПАВ установлено, что на спектрах присутствуют полосы валентных и деформационных колебаний для углеводородных фрагментов (720–725, 1455–1465, 2800–3000 $см^{-1}$) и валентных колебаний –С–О (1010–1130 $см^{-1}$), –С–N (1305 $см^{-1}$), –О–Н (2924 $см^{-1}$) групп. При сопоставлении ИК-спектров для исходных соединений и исследуемых ПАВ обнаружено, что для всех соединений состава ОК+амин и ОК+(амин+ЭРМ) появляется новая характеристическая полоса, не соответствующая исходным соединениям, в диапазоне 1555–1570 $см^{-1}$, отвечающая за деформационные колебания –N–H (полоса вторичного амида карбоновой кислоты, амид II), причем атом водорода при азоте в амидной форме будет иметь нейтральную реакцию. На спектрах соединений ОК+(амин+ЭРМ) есть еще одна полоса поглощения с волновыми числами 1640–1660 $см^{-1}$, которая соответствует валентным колебаниям группы –С=О (полоса амид I). Данные факты свидетельствуют о ряде химических взаимодействий и образовании соединений, содержащих как амино- и амидогруппы, так и гидроксильные и карбоксильные и др. В качестве примера на рис. 2 приведены ИК-спектры для ОК+ПЭГА и ОК+(ПЭГА+ЭРМ).

Таким образом, вещества данного строения можно отнести к цвиттер-ионным ПАВ [9], содержащим в молекуле гидрофильный радикал, способный быть акцептором или донором протона в зависимости от pH раствора. В составе рассматриваемых ПАВ в качестве катионных (щелочных) групп будут выступать аминогруппы, а в качестве анионных (кислотных) – карбоксильные группы, комбинация которых в амфифильной молекуле приводит, как правило, к внутримолекулярному протонному переносу или к образованию резонансных структур с формальным разделением заряда [8]. Поверхностно-активное поведение исследуемых ПАВ, как анионно-ориентированных, обусловлено присутствием ионов Na^+ в водных растворах, характеризующихся pH 11,5.

На рис. 3 приведены изотермы поверхностного натяжения водных растворов исследуемых ПАВ в щелочной среде, которые позволяют зафиксировать два сопряженных явления: завершение формирования адсорбционного слоя на поверхности раствора и возникновение мицелл в объеме жидкой фазы [19]. Полученные в результате эксперимента изотермы для исследуемых ПАВ имеют классический вид [16], характерный для растворов индивидуальных мицеллообразующих ПАВ, что подтверждает факт образования ПАВ в результате химического взаимодействия между компонентами в процессе протекания мультикомпонентной реакции. На основании изотерм поверхностного натяжения σ (рис. 3) рассчитаны коллоидно-химические характеристики ПАВ на границе раздела фаз раствор/воздух, которые представлены в табл. 4.



а *б*

Рис 2. ИК-спектр полученных поверхностно-активных соединений: ОК+ПЭГА (*а*), ОК+(ПЭГА+ЭРМ) (*б*)

Fig. 2. Infrared spectra of derived surface-active compounds: OA+PEHA (*a*), OA+(PEHA+EpRO) (*б*)

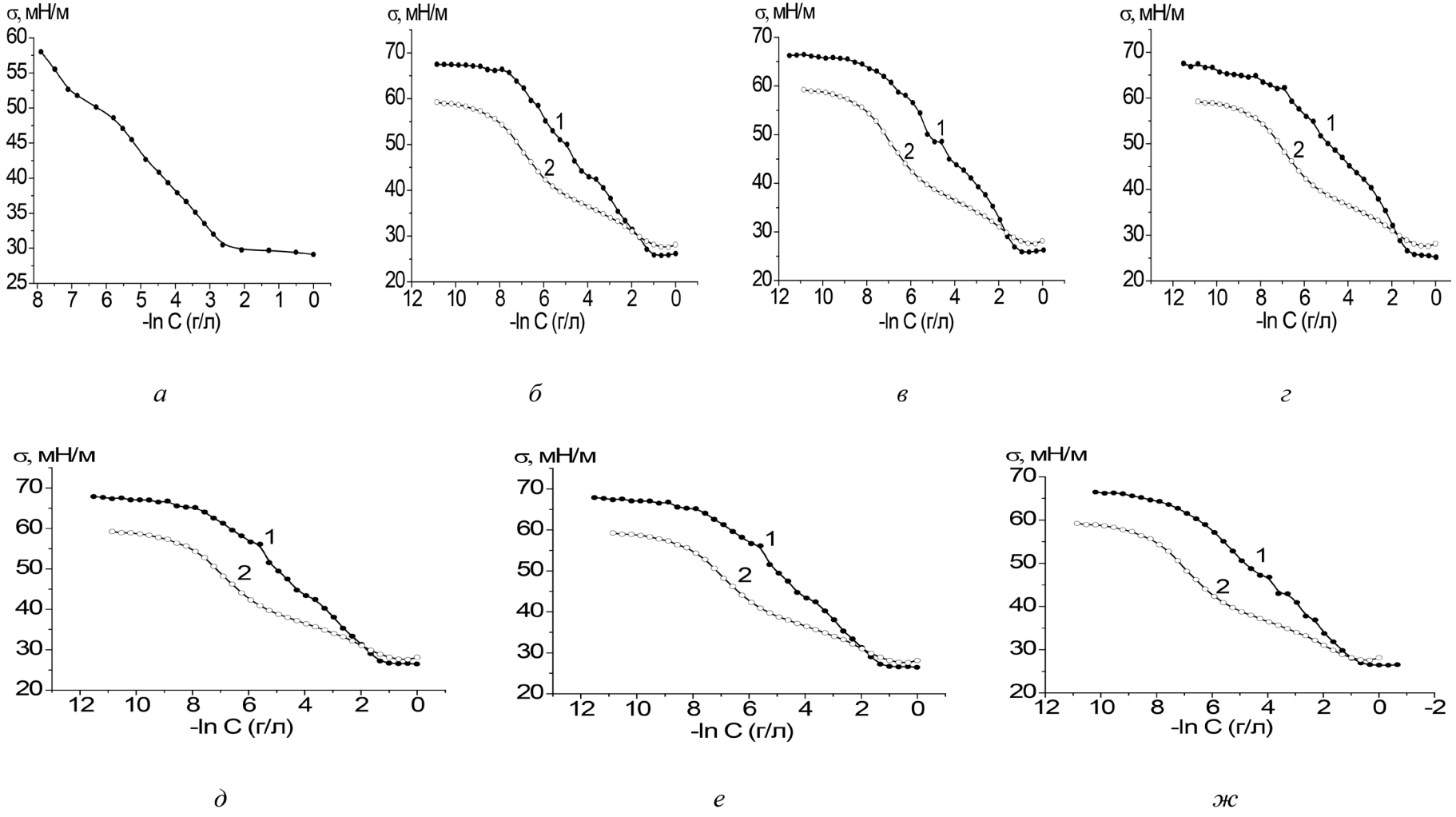


Рис. 3. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов (pH 11,5) исследуемых ПАВ: ОК (*а*) и композиции с аминами разного химического строения ЭДА (*б*), ДЭТА (*в*), ТЭТА (*г*), ТЭПА (*д*), ПЭГА (*е*), А-1000 (*ж*): *1* – ОК+амин; *2* – ОК+(амин+ЭРМ)

Fig. 3. Isotherms of surface tension of water solutions (pH 11.5) of the studied surfactants: OA (*a*) and its compositions with amines of different chemical structure – EDA (*б*), DETA (*в*), TETA (*г*), TEPA (*д*), PEHA (*е*), A-1000 (*ж*): *1* – OA+amine; *2* – OA+(amine+EpRO)

Таблица 4. **Коллоидно-химические характеристики водных растворов ПАВ**
Table 4. **Colloid-chemical characteristics of surfactant water solutions**

ПАВ	$C_{ККМ}$, г/л	$\sigma_{ККМ}$, мН/м	$g*10^3$, Дж*м/моль	$-G*10^3$, Дж/моль	ГЛБ
ОК	0,079	29,11	1505,6	30,74	20,2
ОК+ЭДА	0,347	25,79	1822,8	27,36	21,3
ОК+ДЭТА	0,322	25,86	1815,4	27,87	21,2
ОК+ТЭТА	0,292	25,20	1888,8	28,39	21,0
ОК+ТЭПА	0,265	26,45	1752,3	28,87	20,9
ОК+ПЭГА	0,263	26,90	1706,5	29,13	20,9
ОК+А-1000	0,473	26,41	1756,5	28,74	21,7
ОК+(амин+ЭРМ) в присутствии изопропилового спирта					
ОК+(ЭДА+ЭРМ)	0,356	27,56	1641,4	30,87	21,3
ОК+(ДЭТА+ЭРМ)	0,312	30,81	1363,0	31,39	21,1
ОК+(ТЭТА+ЭРМ)	0,030	30,41	1396,7	37,47	17,9
ОК+(ТЭПА+ЭРМ)	0,013	29,27	1487,2	39,74	16,7
ОК+(ПЭГА+ЭРМ)	0,010	28,67	1539,2	40,62	16,3
ОК+(А-1000+ ЭРМ)	0,027	29,02	1508,5	38,92	17,7

Как видно из данных табл. 4, растворимые в воде исследуемые ПАВ концентрируются в поверхностном слое, т. е. имеет место положительная адсорбция, о наличии которой можно судить по понижению поверхностного натяжения раствора вплоть до значения $C_{ККМ}$.

Более высокие величины поверхностной активности g для соединений ОК+амин по сравнению с ОК доказывают способности исследуемых композиций эффективно понижать поверхностное натяжение. ПАВ состава ОК+(амин+ЭРМ) проявляют большую поверхностную активность, по сравнению с ОК+амин, благодаря большей гидрофобности за счет углеводородных фрагментов ЭРМ. Добавление к ОК большинства аминов и ЭРМ понижает способность ПАВ к мицеллообразованию, приводит к повышению ККМ в 3–6 раз, однако поверхностное натяжение исследуемых ПАВ при достижении ККМ по сравнению с ОК снижается на 0,4–13,4 %, за исключением соединений ОК+(амин+ЭРМ), где в качестве амина выступали ДЭТА, ТЭТА и ТЭПА.

Соединения ОК+ (амин+ЭРМ), где амин – ТЭТА, ТЭПА, ПЭГА, А-1000, позволяют достигнуть ККМ при наиболее низких концентрациях ПАВ в растворе, а также они характеризуются наиболее высокими из исследуемых ПАВ значениями стандартной свободной энергии адсорбции на границе раствор–воздух, что свидетельствует о их способности благодаря большому количеству полярных групп различной химической природы ассоциировать и образовывать структуры из мицелл сложной геометрии, которые могут адсорбироваться на межфазной границе. Для соединений на основе смеси А-1000, вероятно, проявляются стерические затруднения при упаковке в мицеллы громоздких радикалов сложных конфигураций, что и выражается в средних значениях ряда коллоидных свойств.

Для всех исследуемых ПАВ, за исключением соединений на основе смеси А-1000, с ростом степени гидрофобности в гомологическом ряду аминов за счет увеличения длины углеводородного радикала уменьшаются ККМ и ГЛБ и увеличивается абсолютное значение стандартной свободной энергии адсорбции G.

Полученные значения ГЛБ являются критериями поверхностных и объемных свойств ПАВ, а следовательно, и оценками их качества. Значения ГЛБ исследуемых ПАВ довольно высоки (16÷22), что свидетельствует о том, что их можно применять в качестве эмульгаторов при получении эмульсий I рода (масло/вода) [20], в также использовать для разных целей в нефтяной промышленности.

Таким образом, в результате изучения поверхностных свойств синтезированных ПАВ установлено, что они обладают поверхностно-активными свойствами и при их использовании удается достигнуть понижения поверхностного натяжения водных растворов до 25 ÷ 31 мН/м (сильнее всего для соединений ОК+амин) в области довольно низких концентраций ($C_{ККМ} = 1 \cdot 10^{-2} \div 3 \cdot 10^{-2}$ г/л), особенно для композиций ОК+(амин+ЭРМ), где амин – ТЭТА, ТЭПА, ПЭГА и Амин-1000.

Исследуемые ПАВ можно использовать в качестве пенообразователей, поскольку они замедляют течение на поверхности жидкой пленки и определяют соответствующий гидродинамический режим истечения жидкости из пены. Эффективность ПАВ в качестве пенообразователя определяется понижением поверхностного натяжения, поэтому нами в качестве примера было проведено исследование пенообразующей способности водных растворов ПАВ на основе ОК+ПЭГА, которое проявляет высокую растворимость и снижает поверхностное натяжение при ККМ до 26,90 мН/м. В результате проведенных исследований по изучению пенообразующей способности ОК+ПЭГА установлено, что в концентрационном ряду $3{,}12\times10^{-2} \div 3$ мас. % из его водных растворов получается хорошая однородная мелкодисперсная пена. С ростом концентрации ПАВ в растворе увеличивается кратность в 1,4 раза (от 9 до 13) и стабильность пены к разрушению в 4 раза (от 30 мин до 2 ч), что свидетельствует о довольно высоких эксплуатационных свойствах ОК+ПЭГА, который можно использовать, например, при производстве пенобетона, где требуются пенообразователи с кратностью не менее 10.

Таким образом, ПАВ, полученные на основе аминов и карбоновых кислот с использованием методологии «зеленой химии» путем реализации принципа мультикомпонентных реакций, проявляют достаточно хорошие поверхностные и пенообразующие свойства, что свидетельствует о потенциальной возможности их использования с целью импортозамещения в ряде отраслей промышленности.

Список использованных источников

1. Опанасенко, О. Н. Свойства и применение битумных дисперсий и битумно-эмульсионных материалов / О. Н. Опанасенко, Н. П. Крутько. – Минск : Беларус. навука, 2014. – 270 с.

2. Применение многофункциональных поверхностно-активных реагентов для нефтедобычи и транспорта / М. И. Курбанбаев [и др.] // Нефть. Газ. Новации. – 2010. – № 10.– С. 33–38.

3. Получение, физико-химические характеристики, нефтесобирающие и диспергирующие свойства новых поверхностно-активных веществ на основе фракции кислот касторового масла, пропиленоксида и этаноламинов / З. Г. Асадов [и др.] // Хим. журн. Грузии. – 2005. – Т. 5, № 3. – С. 286–299.

4. Борисов, Д. Н. Получение кислородсодержащих четвертичных аммониевых соединений с анионами органических кислот – основы реагентов для нефтяной промышленности / Д. Н. Борисов, П. С. Фахретдинов, Г. В. Романов // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2009. – № 1. – С. 103–107.

5. Abdel-Moghny, Th. Effect of surfactant on the growth of onset aggregation of some Egyptian crude oils / Th. Abdel-Moghny, S. M. Desouky, M. Ramzi // J. of Dispersion Science and Technology. – 2008. – Vol. 29. – P. 397–405.

6. Эмульгаторы обратных эмульсий на основе моноэтаноламидов жирных кислот растительных масел / Е. И. Черных [и др.] // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер.: Химия, биология, фармация. – 2016. – № 1. – С. 35–42.

7. Рагимов, Р. А. Аммониевые соли кислотной фракции рапсового масла / Р. А. Рагимов // Химия растительного сырья. – 2015. – № 2. – С. 97–105.

8. Ланге, К. Р. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение / К. Р. Ланге ; под науч. ред. Л. П. Зайченко. – СПб. : Профессия, 2004. – 240 с.

9. Абрамзон, А. А. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение / А. А. Абрамзон, Л. П. Зайченко, С. И. Файнгольд. – Л. : Химия, 1988. – 200 с.

10. ГОСТ 12497-93. Пластмассы. Соединения эпоксидные. Методы определения содержания эпоксидных групп. – Межгосударственный Совет по стандартизации, метрологии и сертификации. – 1995. – 15 с.

11. ГОСТ 5476-80. Масла растительные. Методы определения кислотного числа. – М.: ИПК изд-во стандартов, 1997. – 10 с.

12. Наканиси, К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений / К. Наканиси. – М.: Мир, 1965. – 216 с.

13. Тарасевич, Б. Н. ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы [Электронный ресурс] / Б. Н. Тарасевич // МГУ им. М. В. Ломоносова. – 2012. – 55 с. – Mode of access : http://www.chem.msu.su/rus/teaching/tarasevich/Tarasevich_IR_tables_29-02-2012.pdf. – Date of access : 14.10.2016.

14. Плетнев, М. Ю. Косметико-гигиенические моющие средства / М. Ю. Плетнев. – М. : Химия, 1990. – 272 с.

15. Tensiometer K100 MK2/SF/C. Instruction Manual V2-05: KRÜSS GmbH, Hamburg, 2001–2005. – 153 p.

16. Абрамзон, А. А. Поверхностно-активные вещества. Свойства и применение / А. А. Абрамзон. – Л. : Химия, 1981. – С. 304.

17. Lin, I. Y. Hydrophile-lipophile balance (hlb) of fluorocarbon surfactants and its relation to the critical micelle concentration (cmc) / I. Y. Lin // J. Phys. Chem. – 1972. – Vol. 76, № 14. – P. 2019–2023.

18. Фролов, Ю. Г. Курс коллоидной химии / Ю. Г. Фролов. – М.: Альянс, 2004. – 464 с.

19. Гельфман, М. И. Коллоидная химия / М. И. Гельфман, О. В. Ковалевич, В. П. Юстратов. – СПб. : Лань, 2003. – 336 с.

20. HLB & Emulsification. Description of Hydrophile, Lipophile Balance and use of HLB in Producing Emulsions (Technical Information Surface Chemistry) [Electronic resourse] // Akzo Nobel Surface Chemistry LLC. – 14 p. – 2008. – Mode of access: https://sc.akzonobel.com/en/fabric-cleaning/Documents/AkzoNobel_tb_HlbEmulsions.pdf. – Date of access: 10.11.2016.

References

1. Opanasenko O. N., Krut'ko N. P., *Svoistva i primenenie bitumnykh dispersii i bitumno-emul'sionnykh materialov* [Properties and application of bitumen dispersions and bitumen emulsion materials], Belarusian Science, Minsk, 2014.

2. Kurbanbaev M. I., Miroshnikov V. Ia., Tolokonskii S. I., Tolokonskaia L. D., "The use of multifunctional surface-active reagents for oil extraction and transport", *Neft'. Gaz. Novatsii* [Oil. Gas. Innovations], 2010, no. 10, pp. 33–38.

3. Asadov Z. G., Aga-zade A. D., Akhmedova G. A., Zarbalieva I. A., Ragimov R. A., Salamova N. V., "Production, physico-chemical characteristics, petroleum-collecting and dispersing properties of the novel surfactants based on the acid fraction of castor oil, propylene oxide and ethanolamines", in *Him. zhurnal Gruzii* [Ghemical Journal of Georgia], 2005, vol. 5, no 3, pp. 286–299.

4. Borisov D. N., Fakhretdinov P. S., Romanov G. V., "Production of oxygen-containing quaternary ammonium compounds with anions of organic acids – bases of the reagents for oil industry", *Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta* [Bulletin of Kazan Technological University], 2009, no. 1, pp. 103–107.

5. Abdel-Moghny Th., Desouky S. M, Ramzi M., "Effect of surfactant on the growth of onset aggregation of some Egyptian crude oils", *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2008, vol. 29, pp. 397–405.

6. Chernykh E. I., Shestakov A. S., Poiarkova , Iliushina K. V., Falaleev A. V., "Emulsifiers of inverse emulsions based on monoethanolamides of fatty acid of vegetable oils", *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriia: Himiia, biologiia, farmaciia* [Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry, Biology and Medicine], 2016, no.1, pp. 35–42.

7. Ragimov R. A., "Ammonium salts of acid fraction of rapeseed oil", *Kimiia rastitel'nogo syr'ia* [Chemistry of vegetable raw materials], 2015, no. 2, pp. 97–105.

8. Lange K. R., *Poverkhnostno-aktivnye veshchestva: sintez, svoistva, analiz, primenenie* [Surfactants: synthesis, properties, analysis, application], Profession, St. Petersburg, RU, 2004.

9. Abramzon A. A., Zaichenko L. P., Faingol'd S. I., *Poverkhnostno-aktivnye veshchestva. Sintez, analiz, svoistva, primenenie* [Surfactants. Synthesis, analysis, properties and application], Chemistry, Leningrad, RU, 1988.

10. International Union of standardization, metrology, certification, *GOST 12497-93. Plastmassy. Soedinenija epoksidnye. Metody opredelenija soderzhanija epoksidnyh grupp* [State Standard 12497-93. Plastics. Epoxy compounds. Methods for determination of the content of epoxy groups], 1995.

11. IPK publishing house of standards, *GOST 5476-80. Masla rastitel'nye. Metody opredelenija kislotnogo chisla* [State Standard 5476-80. Vegetable oils. Methods for determining the acid number], 1997.

12. Nakanishi K., *Infrakrasnye spektry i stroenie organicheskikh soedinenii* [Infrared spectra and structure of organic compounds], World, Moscow, RU, 1965.

13. Tarasevich B. N., "IR spectra of the major classes of organic compounds. Reference materials", Available at: http://www.chem.msu.su/rus/teaching/tarasevich/Tarasevich_IR_tables_29-02-2012.pdf/, (accessed 14 October 2016).

14. Pletnev M. Iu., *Kosmetiko-gigienicheskie moiushchie sredstva* [Cosmetics and sanitary cleaners], Chemistry, Moscow, 1990.

15. Tensiometer K100 MK2/SF/C, Instruction Manual V2-05: KRÜSS GmbH, Hamburg, DE, 2001–2005.

16. Abramzon A. A., *Poverkhnostno-aktivnye veshchestva. Svoistva i primenenie* [Surfactants. Features and applications], Chemistry, Leningrad, RU, 1981.

17. Lin I. Y., "Hydrophile-lipophile balance (hlb) of fluorocarbon surfactants and its relation to the critical micelle concentration (cmc)", *Journal of Physical Chemistry*, 1972, vol. 76, no. 14, pp. 2019–2023.

18. Frolov Iu. G., *Kurs kolloidnoi khimii* [Course of Colloid Chemistry], TID "Alliance", Moscow, 2004.

19. Gel'fman M. I., Kovalevich O. V., Iustratov V. P., *Kolloidnaia khimiia* [Colloid chemistry], Fallow-deer, St. Petersburg, RU, 2003.

20. "HLB & Emulsification. Description of Hydrophile, Lipophile Balance and use of HLB in Producing Emulsions (Technical Information Surface Chemistry). Akzo Nobel Surface Chemistry LLC (2008)", Available at: https://sc.akzonobel.com/en/fabric-cleaning/Documents/AkzoNobel_tb_HlbEmulsions.pdf/, (accessed 10 November 2016).

Информация об авторах

Опанасенко Ольга Николаевна – канд. хим. наук, доцент, зав. лаб., Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ionch@igic.bas-net.by.

Яковец Наталья Вячеславовна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yakov25@tut.by.

Крутько Николай Павлович – академик, д-р хим. наук, зав. отделом, Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: krutko@igic.bas-net.by.

Information about the autors

Olga N. Opanasenko – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Head of Laboratory, Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ionch@igic.bas-net.by.

Natallia V. Yakavets – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher, Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yakov25@tut.by.

Nikolai P. Krut'ko – Academician, D. Sc. (Chemistry), Head of Department, Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: krutko@igic.bas-net.by.

ISSN 1561-8331(print.)

АНАЛІТЫЧНАЯ ХІМІЯ

ANALYTICAL CHEMISTRY

УДК 543.552.054.1:665.3

Поступила в редакцию 21.02.2017
Received 21.02.2017

Н. П. Матвейко[1], А. И. Кулак[2], С. К. Протасов[1], В. В. Садовский[1]

[1]Белорусский государственный экономический университет, Минск, Беларусь
[2]Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ИНВЕРСИОННО-ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЛАХ

Аннотация: Показана возможность инверсионно-вольтамперометрического определения следовых количеств Zn, Cd, Pb, Cu, Hg в растительных маслах без использования процедуры минерализации проб. Установлено, что для достижения высокой чувствительности метода (<0,001 мг/дм^3) целесообразно осуществлять катодное накопление Zn, Cd, Pb, Cu на поверхности индикаторного электрода из амальгамированного серебра, а накопление ртути – на электроде, содержащем 58 % Au, 34 % Cu, 8% Ag. Количество осажденного металла определялось по величине токов его анодного окисления в водно-ацетоновом электролите с добавкой муравьиной (Zn, Cd, Pb, Cu) либо серной (Hg) кислот. Анализ 12 образцов рафинированных и нерафинированных растительных масел – подсолнечного, оливкового, льняного, рапсового и кукурузного – показал наличие в них следовых примесей цинка (0,6–9,6 мг/дм^3), свинца (0,02–0,09 мг/дм^3) и меди (0,02–0,17 мг/дм^3). Кроме того, в восьми образцах масла обнаружены следы ртути (0,002–0,009 мг/дм^3) и в девяти образцах – следы кадмия (0,02–0,05 мг/дм^3). В целом ни в одном из образцов содержание токсичных металлов не превысило допустимых уровней, регламентированных техническими нормативными правовыми актами.

Ключевые слова: электроаналитическая химия, инверсионная вольтамперометрия, растительные масла, тяжелые металлы

Для цитирования: Инверсионно-вольтамперометрическое определение тежелых металлов в растительных маслах / Н. П. Матвейко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 38–44.

N. P. Matveiko[1], A. I. Kulak[2], S. K. Protasov[1], V. V. Sadowski[1]

[1]Belarusian State Economic University, Minsk, Belarus
[2]Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

STRIPPING VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF HEAVY METALS IN VEGETABLE OILS

Abstract: The possibility of stripping-voltammetric determination of Zn, Cd, Pb, Cu, Hg trace amounts in vegetable oils without the use of mineralization procedure has been demonstrated. It has been established that high sensitivity of the method (<0.001 mg/dm^3) can be achieved for Zn, Cd, Pb, Cu by cathodic accumulation on the surface of the amalgamated silver indicator electrode, and by the accumulation of mercury on the electrode containing 58 % Au, 34 % Cu, 8% Ag. The amount of the deposited metal has been determined by the magnitude of the anodic current in an aqueous-acetone electrolyte containing formic (Zn, Cd, Pb, Cu) or sulfuric (Hg) acid additives. Analysis of twelve refined and unrefined vegetable oil samples (sunflower, olive, linseed, rapeseed, and corn) showed the presence of trace impurities of zinc (0.6–9.6 mg/dm^3), lead (0.02–0.09 mg/dm^3), and copper (0.02–0.17 mg/dm^3). Additional traces of mercury (0.002–0.009 mg/dm^3) were detected in eight oil samples and cadmium traces (0.02–0.05 mg/dm^3) in nine samples. In general, the content of toxic metals in the samples does not exceed the permissible levels governed by technical regulations.

Keywords: electroanalytical chemistry, stripping voltammetry, vegetable oils, heavy metals

For citation: Matveiko N. P., Kulak A. I., Protasov S. K., Sadowski V. V. Stripping voltammetric determination of heavy metals in vegetable oils. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 38–44 (In Russian).

Введение. Следовые количества металлов в растительных маслах могут аккумулироваться из окружающей среды вблизи промышленных предприятий и магистралей, из почвы, удобрений и средств защиты растений, а также попадать в масла на различных стадиях переработки растительного сырья – при отбеливании, закаливании, дезодорации, в результате коррозии технологического оборудования. Особо нежелательными примесями, естественно, являются такие высокотоксичные металлы, как кадмий, свинец, ртуть. Переходные металлы, кроме того, могут

играть роль промоторов свободнорадикальных окислительных процессов, вызывая существенное ухудшение качества и органолептических характеристик масел при их хранении [1–3].

Для определения следов тяжелых металлов в растительных маслах применяют методы атомно-абсорбционной спектрофотомерии [4–6], масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой [7, 8], ионной хроматографии [9]. Значительное внимание уделялось электрохимическим методам – инверсионной потенциометрии [10–12], адсорбционной [13, 14] и прямой [15] инверсионной вольтамперометрии.

Количественное определение в растительных маслах следов металлов является сложной аналитической задачей из-за их низкой концентрации и необходимости использования трудоемких процедур пробоподготовки, таких как кислотная обработка [5, 8, 11–13], получение водно-масляных микроэмульсий [7], разрушение органической матрицы путем сухого или мокрого озоления [6, 14, 15].

Цель настоящей работы – разработка метода определения цинка, кадмия, свинца, меди и ртути в образцах растительных масел методом инверсионной вольтамперометрии без использования процедуры минерализации проб.

Методика эксперимента. Для проведения анализов использовались образцы как рафинированных, так и нерафинированных растительных масел: подсолнечного, оливкового, льняного, рапсового и кукурузного из торговой сети г. Минска (табл. 1).

Таблица 1. **Сведения об образцах растительного масла, использовавшихся для анализа**

Table 1. **Information about vegetable oil samples used for the analysis**

Номер образца	Название масла (страна производитель)	Сведения об образцах масла	Стандарт
1	Подсолнечное (Украина)	Рафинированное, дезодорированное, вымороженное	ДСТУ 4492:2005
2	Подсолнечное (Россия)	Рафинированное, дезодорированное, вымороженное	ГОСТ 1129–2013
3	Подсолнечное (Республика Татарстан)	Рафинированное, дезодорированное, вымороженное	ГОСТ 1129–2013
4	Подсолнечное (Украина)	Нерафинированное, вымороженное, прессовое	ДСТУ 4492:2005
5	Подсолнечное (Россия)	Нерафинированное	ГОСТ 1129–2013
6	Подсолнечное (Беларусь)	Рафинированное, дезодорированное, вымороженное	ГОСТ 1129–2013
7	Подсолнечное с добавлением оливкового (Россия)	Рафинированное, дезодорированное, вымороженное подсолнечное и рафинированное оливковое	ТУ 9141–015–0333693–01
8	Оливковое (Италия)	Нерафинированное, прессовое	–
9	Кукурузное (Россия)	Рафинированное, дезодорированное	ГОСТ 8808–2000
10	Рапсовое (Беларусь)	Рафинированное, дезодорированное, марки «П»	СТБ 1486 ТИ БРЗМ 700067240.05
11	Льняное (Беларусь)	Нерафинированное, холодный отжим	ТУ РБ 101191824.649–2000
12	Льняное (Беларусь)	Нерафинированное, холодный отжим	ТУ ВУ 290340416.001

Предварительное исследование показало, что все анализируемые масла, хотя и растворяются в ряде органических растворителей (бензоле, толуоле, ацетоне, диэтиловом эфире и др.), но в присутствии необходимого для проведения электрохимических измерений количества воды устойчивыми являются лишь растворы в ацетоне. Для приготовления проб навеску растительного масла массой 0,1 г растворяли в 2,5 см^3 ацетона. Для определения Zn, Cd, Pb, Cu отбирали 0,05–0,07 см^3 аликвоты, помещали ее в двухэлектродную кварцевую электрохимическую ячейку, добавляли 0,135 см^3 концентрированной муравьиной кислоты и доводили объем раствора до 10 см^3 бидистиллятом. При определении ртути объем аликвоты снижали до 0,01 см^3 (при большем содержании ртути осложняется ее накопление на катоде) затем добавляли по 0,02 см^3 8 М раствора H_2SO_4 и 1 М раствора KCl, раствор доводили до 10 см^3 бидистиллятом. В качестве фонового раствора при определении Zn, Cd, Pb, Cu использовали водный 0,35 М раствор муравьиной

кислоты, а при определении ртути – раствор, содержащий 0,016 моль/дм^3 H_2SO_4 и 0,002 моль/дм^3 KCl; во все пробы фонового электролита добавляли по 0,07 см^3 ацетона.

Для сопоставления часть экспериментов была выполнена с использованием процедуры мокрой минерализации. Для этого в кварцевый стакан помещали пробу анализируемого масла массой 0,5 г, добавляли 3 см^3 10 %-ного спиртового раствора нитрата магния. Затем раствор выпаривали, а осадок обугливали, постепенно поднимая температуру до 400 °С и выдерживая при этой температуре 30 мин с последующим озолением в течение 30 мин при температуре 500 °С. Полученную золу растворяли в смеси 2 см^3 концентрированной HNO_3 и 1 см^3 30 %-ного раствора пероксида водорода, после чего выпаривали досуха при температуре 150 °С. Образовавшийся осадок повторно озоляли в течение 180 мин при температуре 500 °С, затем золу растворяли в 1 см^3 муравьиной кислоты. Объем раствора доводили бидистиллятом до 10 см^3 и из полученного раствора для анализа отбирали аликвоту объемом 1 см^3.

Электрохимические измерения проводили на вольтамперометрическом анализаторе ТА-4 (Томаналит, Томск, РФ). Содержание Zn, Cd, Pb, Cu определяли на индикаторном электроде из амальгамированной серебряной проволоки, а содержание ртути – на электроде из золота 583 пробы, поверхность которого механически обновляли перед исследованием каждой пробы. Вспомогательным электродом и электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод в 1 М растворе хлорида калия. Все электрохимические измерения проводили при температуре 25 °С; растворенный кислород из рабочих растворов не удалялся.

Определение тяжелых металлов осуществляли методом добавок стандартных растворов, содержащих 1 мг/дм^3 Hg, 2 мг/дм^3 Cd, Pb, Cu и 3 мг/дм^3 Zn, приготовленных на основе государственных стандартных образцов (ГСО). Содержание металла в образцах растительного масла рассчитывали по разности тока на вольтамперных кривых пробы и фона, а также пробы с добавкой стандартного раствора и фона, используя специализированную программу VALabTx (Томаналит, РФ).

Каждую пробу растительного масла анализировали 4 раза и рассчитывали относительные стандартные отклонения (S_r) и интервальные значения ($\pm\Delta x$) содержания металлов в образцах растительного масла.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что для инверсионно-вольтамперометрического определения Zn, Cd, Pb и Cu в растительных маслах электрохимическую очистку индикаторного электрода целесообразно проводить в течение 20 с при чередовании анодной (+100 мВ) и катодной (–1150 мВ) поляризации. Продолжительность катодного накопления металлов при потенциале –1350 мВ составляет 100 с. После успокоения раствора при потенциале –1130 мВ в течение 15 с можно проводить регистрацию анодной поляризационной кривой в интервале от –1130 до +100 мВ с линейной разверткой потенциала со скоростью 80 мВ/с.

Для определения ртути электрохимическую очистку индикаторного электрода целесообразно проводить при потенциале +630 мВ в течение 15 с, процесс накопления – при –600 мВ, 240 с и успокоение раствора – при +340 мВ, 25 с. Регистрация анодной вольтамперной кривой осуществляется при скорости развертки потенциала 6 мВ/с в интервале от +340 до +600 мВ.

На рис. 1 и 2 приведены типичные примеры анодных вольтамперных кривых, характеризующих зависимость тока окисления накопленного металла на поверхности индикаторного электрода от его электродного потенциала. Для всех исследовавшихся проб растительного масла, как и для образца № 12 (льняное масло), вольтамперные кривые содержат четыре максимума тока при потенциалах –840, –460, –290 и –15 мВ, которые связаны с анодным окислением Zn, Cd, Pb и Cu соответственно как при растворении пробы в ацетоне (рис. 1 *а*), так и при подготовке пробы мокрой минерализацией (рис. 1, *б*). Введение стандартного раствора, содержащего Zn, Cd, Pb и Cu, в растворы проб льняного масла приводит к пропорциональному увеличению анодного тока на вольтамперных кривых (кривая *3*) в максимумах тока окисления металлов. Близкое подобие вольтамперных кривых, приведенных на рис. 1, *а* и *б*, для проб без минерализации и с мокрой минерализацией свидетельствует о возможности использования метода инверсионно-вольтамперометрического определения Zn, Cd, Pb и Cu в образцах растительного масла без применения трудоемкой операции мокрой минерализации проб.

Из рис. 2 следует, что на поляризационной кривой в фоновом электролите отсутствуют токи, обусловленные окислением примесей, что указывает на высокую чистоту фонового электролита

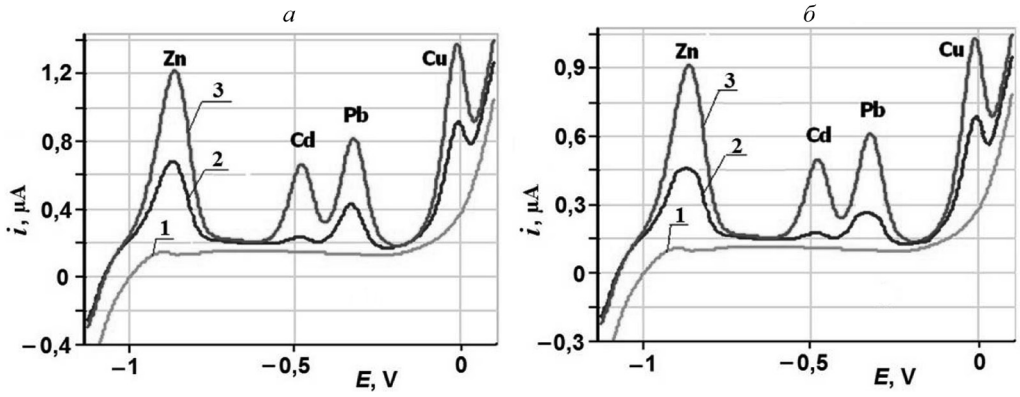


Рис. 1. Анодные вольтамперные кривые, полученные на индикаторном электроде из амальгамированного серебра для определения Cd, Pb, Cu и Zn в образце льняного масла (проба № 12) без минерализации (*а*) и с мокрой минерализацией пробы (*б*): 1 – фоновый электролит (0,35 моль/дм^3 муравьиной кислоты и 0,095 моль/дм^3 ацетона); *2* – раствор пробы образца масла; *3* – раствор пробы образца масла с добавкой стандартного раствора (2 мг/дм^3 Cd, Pb, Cu; 3 мг/дм^3 Zn)

Fig. 1. Anodic current-voltage curves obtained at the amalgamated silver indicator electrode for the determination of Cd, Pb, Cu, and Zn in a linseed oil sample (sample № 12) without mineralization (*a*) and after wet mineralization (*б*): *1* – supporting electrolyte 0.35 mol/dm^3 formic acid and 0.095 mol/dm^3 acetone; *2* – oil solution; *3* – oil with the addition of the standard solution containing 2 mg/dm^3 Cd, Pb, Cu, and 3 mg/dm^3 Zn

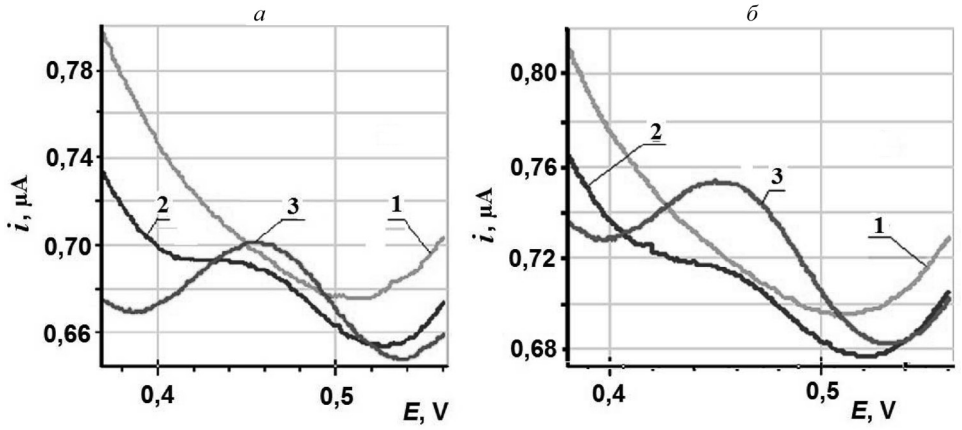


Рис. 2. Анодные вольтамперные кривые, полученные на золотом электроде для определения ртути в образце подсолнечного масла (проба № 4) без минерализации (а) и с мокрой минерализацией пробы (б): *1* – фоновый электролит (0,0175 моль/дм^3 H_2SO_4 + 0,002 моль/дм^3 KCl); *2* – раствор пробы образца масла; *3* – раствор пробы образца масла с добавкой 0,01 см^3 стандартного раствора, содержащего 2 мг/дм^3 Hg

Fig. 2. Anodic current-voltage curves obtained at the gold electrode for the determination of mercury in the sample of sunflower oil (sample № 4) without mineralization (*a*) and after wet mineralization (*б*): *1* – supporting electrolyte (0.0175 mol/dm^3 H_2SO_4 + 0,002 mol/dm^3 KCl); *2* – oil sample; *3* – oil sample with the addition of 0.01 cm^3 of a standard solution containing 2 mg/dm^3 Hg

и, в частности, на отсутствие в нем ртути (в пределах чувствительности метода). На вольтамперных кривых, зарегистрированных в растворе проб образца растительного масла № 4, независимо от способа подготовки пробы наблюдается увеличение анодного тока в интервале потенциалов 400–530 мВ, что связано с анодным окислением ртути, осажденной на индикаторный электрод в процессе ее накопления. Введение стандартного раствора ртути (2 мг/дм^3 Hg) в раствор пробы образца растительного масла приводит к пропорциональному возрастанию тока окисления в интервале потенциалов 400–530 мВ. Следует отметить, что при определении Zn, Cd, Pb, Cu, Hg токи окисления на вольтамперных кривых пробы растительного масла без минерализации (рис. 2, *а*) и с мокрой минерализацией (рис. 2, *б*) совпадают по потенциалам максимумов и оказываются сопоставимыми по абсолютным значениям токов (некоторые различия в последних легко устраняются посредством соответствующих калибровочных процедур).

Подобные результаты по определению металлов получены в масле подсолнечном с добавлением оливкового (образец № 7), а также установлено близкое подобие вольтамперных кривых для образцов, подвергавшихся и не подвергавшихся мокрой минерализации. Поэтому определения металлов в остальных образцах растительного масла (№ 1–3,5,6) проводили без использования мокрой минерализации проб, ограничиваясь их растворением в ацетонсодержащих электролитах. Результаты определений приведены в табл. 2.

Таблица 2. **Содержание (мг/дм^3) цинка, кадмия, свинца, меди и ртути в образцах растительного масла, определенное методом инверсионной вольтамперометрии (номера образцов соответствуют номерам в табл. 1)**

Table 2. **Zinc, cadmium, lead, copper and mercury content (mg/dm^3) in vegetable oil samples determined by stripping voltammetry method (sample numbers are the same as in Table 1)**

Номер образца	Zn	Cd	Pb	Cu	Hg
1	6,1±0,12	0,03±0,002	0,07±0,003	0,17±0,008	0,006±0,0004
2	8,7±0,16	0,05±0,003	0,09±0,004	0,02±0,001	<0,001
3	2,5±0,05	0,03±0,002	0,02±0,001	0,02±0,001	<0,001
4	7,8±0,16	0,03±0,002	0,09±0,004	0,03±0,002	0,009±0,0007
5	4,6±0,09	0,04±0,002	0,06±0,003	0,04±0,002	0,008±0,0007
6	2,4±0,05	0,03±0,002	0,04±0,002	0,02±0,001	0,009±0,0007
6*	7,5±0,15	0,03±0,002	0,07±0,003	0,03±0,002	0,008±0,0006
7	9,6±0,17	0,05±0,003	0,08±0,003	0,02±0,001	<0,001
7*	9,2±0,17	0,04±0,002	0,07±0,003	0,02±0,001	<0,001
8	0,6±0,01	<0,001	0,02±0,001	0,03±0,002	0,002±0,0001
9	8,4±0,15	0,02±0,001	0,09±0,004	0,09±0,004	0,006±0,0005
10	2,1±0,03	<0,001	0,07±0,003	0,06±0,003	<0,001
11	5,1±0,10	<0,001	0,09±0,004	0,08±0,004	0,005±0,0003
12	3,2±0,06	0,04±0,002	0,07±0,003	0,11±0,006	0,007±0,0005
12*	3,1±0,06	0,03±0,002	0,06±0,002	0,09±0,005	0,006±0,0004
**	–	0,05	0,1	0,1 (0,4)	0,03

Примечание. *С минерализацией; **согласно требованиям ТР ТС 021/2011 (не более).

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют, что во всех изученных образцах растительного масла содержатся примеси цинка, свинца и меди. В восьми образцах масла имеются также следы ртути. Следы кадмия не обнаружены в трех из 12 изученных образцов растительного масла (№ 8, 10, 11). Наибольшее содержание характерно для цинка (от 0,6 мг/кг для образца № 8 до 9,6 мг/кг для образца № 7) и наименьшее – для ртути (от 0,002±0,0001 мг/кг для образца № 8 до 0,009±0,0007 мг/кг для образцов № 4 и 6). Содержание свинца во всех изученных образцах растительного масла не превышает 0,1 мг/кг (допустимое содержание, нормируемое ТНПА), но для образцов № 2 и 4 оно лишь на 0,01 мг/кг меньше этого нормируемого уровня.

В целом можно заключить, что во всех проанализированных образцах растительных масел содержание тяжелых металлов не превышает допустимых значений, регламентированных техническими нормативными правовыми актами – техническим регламентом таможенного союза ТР ТС 021/2011 и санитарными правилами и нормами СанПиН № 52 РБ, 21.07.2013. Важно, что на примере нескольких образцов растительного масла нами установлено, что содержание тяжелых металлов, определенное инверсионно-вольтамперометрическим методом с использованием подготовки проб растворением навесок масла в ацетоне, практически совпадает с содержанием металлов после традиционной трудоемкой подготовки проб масла мокрой минерализацией. Близкое совпадение анодных вольтамперных кривых для обоих методов предподготовки позволяет заключить, что для анализа растительных масел на содержание цинка, кадмия, свинца, меди и ртути достаточно ограничиться подготовкой проб путем их растворения в ацетонсодержащем электролите. Предложенный способ пробоподготовки позволит, кроме того, снизить возможное загрязнение проб масла примесями, содержащимися в реактивах, используемых для минерализации, исключить применение высоких температур и уменьшить время подготовки проб в десятки раз по сравнению требуемым в методе мокрой минерализации.

Список использованных источников

1. Aparicio, R. Handbook of olive oil /R. Aparicio, J. Harwood // Analysis and propertie/ 2nd Ed. Springer. – New York, 2013. – pp. 497–498. doi: 10.1007/978-1-4614-7777-8.

2. Choe, E. Mechanisms and factors for edible oil oxidation/E. Choe, D. B. Min //Comprehensive reviews in food science and food safety. – 2006. Vol. 5, N 4. – P. 169–186. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.00009. x.

3. Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions / A. Bendini [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – Vol. 54, N 13. – P. 4880–4887. doi: 10.1021/jf060481r.

4. Determination of trace elements in vegetable oils and biodiesel by atomic spectrometric techniques–a review / F. G. Lepri [et al.] // Applied Spectroscopy Reviews. – 2011. – Vol. 46, N 3. – P. 175–206. doi: 10.1080/05704928.2010.529628.

5. Mendil, D. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry / D. Mendil [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – Vol. 165, N 1. – P. 724–728. doi: 10.1016/j. jhazmat.2008.10.046.

6. Raptis, S. E. The decomposition of oils and fats in a stream of oxygen for the determination of trace elements / S. E. Raptis, G. Kaiser, G. Tölg // Analytica Chimica Acta. – 1982. – Vol. 138. – P. 93–101. doi: 10.1016/S0003-2670(01)85291-0.

7. Castillo, J. R. Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization / J. R. Castillo, M. S. Jiménez, L. Ebdon // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 1999. – Vol. 14, N 9. – P. 1515–1518. doi: 10.1039/A900754G.

8. Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain / E. J. Llorent-Martínez [et al.] // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 127, N 3. – pp. 1257–1262. doi: 10.1016/j. foodchem.2011.01.064.

9. Buldini, P. L. Determination of some inorganic species in edible vegetable oils and fats by ion chromatography / P. L. Buldini, D. Ferri, & J. L. Sharma // Journal of Chromatography A. – 1997. – Vol. 789(1). – P. 549–555. doi: 10.1016/S0021-9673(97)00822-4.

10. Determination of cadmium (II) and zinc (II) in olive oils by derivative potentiometric stripping analysis / F. L. Coco [et al.] // Food Control. – 2003. – Vol. 14. N 1. – P. 55–59. doi: 10.1016/S0956-7135(02)00054-3.

11. Dugo, G. Determination of Cd (II), Cu (II), Pb (II), and Zn (II) content in commercial vegetable oils using derivative potentiometric stripping analysis / G. Dugo [et al.] Food Chemistry. – 2004. – Vol. 87, N 4. – P. 639–645. doi: 10.1016/j. foodchem.2003.12.035.

12. Derivative potentiometric stripping analysis (dPSA) used for the determination of cadmium, copper, lead, and zinc in Sicilian olive oils / La Pera L. [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2002. – Vol. 50, N 11. – P. 3090–3093. doi: 10.1021/jf0113124.

13. Determination of copper with 5, 5-dimethylcyclohexane-1, 2, 3-trione 1, 2-dioxime 3-thiosemicarbazone in olive oils by adsorptive stripping square wave voltammetry / T. G. Díaz [et al.] // Food Chemistry. – 2006. – Vol. 96, N 1. – P. 156–162. doi: 10.1016/j. foodchem.2005.04.014.

14. New determination of lead in edible oil and water samples by high selective adsorptive stripping voltammetry with SPADNS / Sh. Abbasi [et al.] // International Journal of Electrochemical Science. – 2009. – Vol. 4. – P. 602–613.

15. Wahdat, F. Direct inverse voltammetric determination of Pb, Cu and Cd in some edible oils after solubilization / F. Wahdat, S. Hinkel, R. Neeb // Fresenius' journal of analytical chemistry. – 1995. – Vol. 352, N 3–4. – P. 393–394. doi: 10.1007/BF00322240.

References

1. Aparicio R., Harwood J., "Handbook of olive oil", *Analysis and properties*, 2nd ed., Springer, New York, US, 2013, pp. 497–498, doi: 10.1007/978-1-4614-7777-8.

2. Choe E., Min D. B., "Mechanisms and factors for edible oil oxidation", *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2006, vol. 5, no. 4, pp. 169–186, doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x.

3. Bendini A., Cerretani L., Vecchi S., Carrasco-Pancorbo A., Lercker G., "Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, no. 13, pp. 4880–4887, doi: 10.1021/jf060481r.

4. Lepri F. G., Chaves E. S., Vieira M. A., Ribeiro A. S., Curtius A. J., DeOliveira L. C., DeCampos R. C., "Determination of trace elements in vegetable oils and biodiesel by atomic spectrometric techniques–a review", *Applied Spectroscopy Reviews*, 2011, vol. 46, no. 3, pp. 175–206, doi: 10.1080/05704928.2010.529628.

5. Mendil D., Uluözlü Ö. D., Tüzen M., Soylak M., "Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry", *Journal of Hazardous Materials*, 2009, vol. 165, no. 1, pp. 724–728, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.10.046.

6. Raptis, S. E., Kaiser, G., Tölg, G., "The decomposition of oils and fats in a stream of oxygen for the determination of trace elements", *Analytica Chimica Acta*, 1982, vol. 138, pp. 93–101, doi: 10.1016/S0003-2670(01)85291-0.

7. Castillo J. R., Jiménez M. S., Ebdon L., "Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, vol. 14, no. 9, pp. 1515–1518, doi: 10.1039/A900754G.

8. Llorent-Martínez E. J., Ortega-Barrales P., Fernández-de Córdova M. L., Domínguez-Vidal A. R. M. A., Ruiz-Medina A., "Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain", *Food Chemistry*, 2011, vol. 127, no. 3, pp. 1257–1262, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.064.

9. Buldini, P. L., Ferri, D., Sharma, J. L., "Determination of some inorganic species in edible vegetable oils and fats by ion chromatography", *Journal of Chromatography A*, 1997, vol. 789, no. 1, pp. 549–555, doi: 10.1016/S0021-9673(97)00822-4.

10. Coco F. L., Ceccon L., Ciraolo L., Novelli V., "Determination of cadmium (II) and zinc (II) in olive oils by derivative potentiometric stripping analysis", *Food Control*, 2003, vol. 14, no. 1, pp. 55–59, doi: 10.1016/S0956-7135(02)00054-3.

11. Dugo G., La Pera L., La Torre G. L., Giuffrida D., "Determination of Cd (II), Cu (II), Pb (II), and Zn (II) content in commercial vegetable oils using derivative potentiometric stripping analysis", *Food Chemistry*, 2004, vol. 87, no. 4, pp. 639–645, doi: 10.1016/j.foodchem.2003.12.035.

12. La Pera L., Lo Curto S., Visco A., La Torre L., Dugo G., "Derivative potentiometric stripping analysis (dPSA) used for the determination of cadmium, copper, lead, and zinc in Sicilian olive oils", *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, vol. 50, no. 11, pp. 3090–3093, doi: 10.1021/jf0113124.

13. Díaz T. G., Guiberteau A., Soto M. L., Ortiz J. M., "Determination of copper with 5, 5-dimethylcyclohexane-1, 2, 3-trione 1, 2-dioxime 3-thiosemicarbazone in olive oils by adsorptive stripping square wave voltammetry", *Food Chemistry*, 2006, vol. 96, no. 1, pp. 156–162, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.04.014.

14. Abbasi Sh., Allahyari M., Taherimaslak Z., Nematollahi D., Abbasi F., "New determination of lead in edible oil and water samples by high selective adsorptive stripping voltammetry with SPADNS", *International Journal of Electrochemical Science*, 2009, vol. 4, pp. 602–613.

15. Wahdat F., Hinkel S., Neeb R., "Direct inverse voltammetric determination of Pb, Cu and Cd in some edible oils after solubilization", *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 1995, vol. 352, no. 3-4, pp. 393–394, doi: 10.1007/BF00322240.

Информация об авторах

Матвейко Николай Петрович – д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой, Белорусский государственный экономический университет (ул. Свердлова, 7/5, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: matveiko np@mail.ru.

Кулак Анатолий Иосифович – член-кор., д-р хим. наук, профессор, директор, Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул.Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulak@igic.bas-net.by.

Протасов Семен Корнеевич – канд. техн. наук, доцент, Белорусский государственный экономический университет (ул. Свердлова, 7/5, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: protasov.s@belstu.by.

Садовский Виктор Васильевич – д-р техн. наук, профессор, первый проректор, Белорусский государственный экономический университет (пр. Партизанский, 26, 220070, Минск Республика Беларусь). E-mail:sadovskiv@bseu.by.

Information about the authors

Nikolai P. Matveiko – D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Department, Belarusian State Economic University (7/5, Sverdlov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: matveiko np@mail.ru.

Anatoly I. Kulak – Cor. Member, D. Sc. (Chemistry), Professor, Director, Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulak@igic.bas-net.by.

Semen K. Protasov – Ph. D. (Technology), Associate Professor, Belarusian State Economic University (7/5, Sverdlov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: protasov.s@belstu.by.

Viktor V. Sadovsky – D. Sc. (Technology), Professor, Vice-Rector, Belarusian State Economic University (26, Partizanski Ave., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sadovski v@bseu.by.

ISSN 1561-8331(print.)
УДК 543.429.23:582.998

Поступила в редакцию 21.02.2017
Received 21.02.2017

С. Н. Шиш[1], А. Г. Шутова[1], Е. Д. Скаковский[2], Л. Ю. Тычинская[2]

[1]Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

СОСТАВ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ СОЦВЕТИЙ КАЛЕНДУЛЫ МЕТОДОМ ЯМР

Аннотация: Методом ЯМР исследован состав водных экстрактов соцветий календулы лекарственной сортов «Гейша», «Махровый 2000», «Дракон», «Принц Индии». Для анализа использовали соцветия календулы. Растения выращивали на экспериментальном участке отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Соцветия сорта «Махровый 2000» собирали в июле 2013–2016 гг., остальных сортов – в 2016 г. Сырье высушивали до воздушно-сухого состояния и хранили в темноте, а затем измельчали в агатовой ступке либо в кофемолке. Экстракцию осуществляли дистиллированной и дейтерированной водой (D_2O) в соотношении растительное сырье : экстрагент = 1:15. В результате установлены качественный и количественный составы водных экстрактов изучаемых сортов. В исследованных образцах обнаружено 11 аминокислот: аланин, γ-аминомасляная кислота, аспарагин, валин, глутамин, изолейцин, лейцин, пролин, тирозин, треонин и фенилаланин, среди которых преобладали аспарагин и пролин. Кроме того, определены моносахариды: 2 изоформы глюкозы и 3 изоформы фруктозы. Анализ спектров на ядрах ^{31}P показал, что в водном экстракте цветков календулы в заметных количествах присутствуют и фосфаты. Показано, что сорта календулы «Гейша», «Махровый 2000», «Принц Индии» имели сходный качественный и количественный составы углеводов и сахаров. Спектрально отличались экстракты сорта «Дракон», в пуле аминокислот преобладал аспарагин, а содержание β-фруктопиранозы было понижено по сравнению с другими сортами.

Ключевые слова: соцветия календулы, водные экстракты, ЯМР анализ, аминокислоты, моносахариды

Для цитирования: Состав водных экстрактов соцветий календулы методом ЯМР / С. Н. Шиш [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 45–52.

S. N. Shysh[1], H. G. Shutava[1], E .D. Skakovski[2], L. Yu. Tychinskaya[2]

[1]The Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]The Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

NMR INVESTIGATION OF THE COMPOSITION OF AQUEOUS EXTRACTS FROM POT MARIGOLD INFLORESCENCE

Abstract: Using NMR analysis, the composition of the aqueous extracts of pot marigold inflorescence of cultivars “Geisha”, “Mahrovy 2000”, “Dragon”, “Prince of India” were investigated. Inflorescences of pot marigold were used for the analysis. Plants were grown in the experimental area of the Department of Biochemistry and Biotechnology of Plants of Central Botanical Garden of the NAS of Belarus. Inflorescence of “Mahrovy 2000” was collected in July 2013–2016, other varieties – in 2016. The raw materials were air dried and kept in the dark, then crushed in an agate mortar or in a coffee grinder. The extraction was performed with distilled and deuterated water (D_2O) at a ratio of plant raw material : extractant = 1 : 15. As a result, the qualitative and quantitative composition of aqueous extracts of cultivars was determined. In the investigated samples 11 aminoacids: alanine, γ-aminobutyric acid, asparagine, valine, glutamine, isoleucine, leucine, proline, tyrosine, threonine and phenylalanine were determined, asparagine and proline prevailed. Monosaccharides, such as 2 isoforms of glucose and 3 isoforms of fructose, were determined as well. Analysis of the spectra on ^{31}P showed that phosphate is present in significant amounts in the aqueous extract of pot marigold flowers. “Geisha”, “Mahrovy 2000” and “Prince of India” varieties were shown to have similar qualitative and quantitative composition of carbohydrates and sugars. Spectrum of extracts of the variety “Dragon” was different from the others with the asparagine predomination in the pool of amino acids, and the content of β-fructopyranose lower in comparison with other varieties.

Keywords: pot marigold inflorescence, aqueous extracts, NMR analysis, aminoacids, monosaccharides

For citation: Shysh S. N., Shutava H. G., Skakovski E. D., Tychinskaya L. Yu. NMR investigation of the composition of aqueous extracts from pot marigold inflorescence. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 45–52 (In Russian).

Введение. *Calendula officinalis* L. – однолетнее травянистое растение семейства Asteraceae, широко используемое в медицинской практике. В результате химических исследований в *C. officinalis* установлено присутствие различных классов соединений, в том числе терпенов, фенолов, липидов, углеводов и др. [1]. В цветочных корзинках растения содержатся каротиноиды (около 3%): β-каротин, рубиксантин, ликопин, цитроксантин, виолоксантин, флавохром, флавоксантин и др., также в соцветиях календулы найдены углеводороды парафинового ряда, три-

терпеновые гликозиды, флавоноиды, горькие вещества и органические кислоты [2]. Другие биологически активные вещества цветков календулы остаются малоизученными.

В литературе описаны преимущественно спиртовые и водно-спиртовые экстракты измельченных воздушно-сухих цветков календулы. Водные экстракты, как правило, отличаются своим составом и практически не изучены, хотя экстракция растительного сырья водой происходит при заваривании фиточаев, травяных сборов и т.п.

В качестве инструментальной базы для контроля компонентного состава экстрактов преимущественно используются методы хроматографии. Хроматограммы дают исчерпывающую информацию о составе всех компонентов, однако, для получения достоверных результатов при анализе смесей в хроматографии предполагается использование различных колонок и наличие индивидуальных компонентов, что увеличивает время анализа. Ранее нами было показано [3], что метод ЯМР высокого разрешения обладает высокой чувствительностью, позволяющей анализировать водные экстракты на различных ядрах, давая достоверные результаты. Цель настоящей работы – анализ методом ЯМР водных экстрактов соцветий календулы разных сортов.

Материалы (объекты) и методы исследования. Для исследований выбраны следующие сорта календулы: «Гейша», «Махровый 2000», «Дракон», «Принц Индии» (рис. 1).

Изучаемые сорта имеют следующие характеристики:

Махровый 2000 – куст ветвистого типа, сильнооблиственный. Высота – 60–70 см. Лист зеленый, опушенный. Соцветие средней плотности, диаметром 7,9 см, расположено на верхушках стебля и боковых побегах, среднее количество соцветий на одном растении 25–32 шт., соцветий на цветоносе 1 шт. Цветок сильномахровый, ярко-оранжевой окраски. Цветонос прочный.

Гейша – сильноветвистое растение высотой до 55 см, с крупными густомахровыми соцветиями, черепитчатой формы, диаметром до 10 см. Типы цветков в соцветии: язычковые (ярко-оранжевые), трубчатые (темно-бордовые). Сорт отличается декоративностью, устойчив в срезке в течение 1–2 недель.

Дракон – высота до 70 см. Соцветия густомахровые отличаются двойной окраской: внутри нежно персиковые, а снаружи насыщенно-оранжевые. Отличается повышенной декоративностью, подходит для срезки.



Рис. 1. Сорта календулы лекарственной: *а* – «Гейша»; *б* – «Махровый 2000»; *в* – «Дракон»; *г* – «Принц Индии»

Fig. 1. Pot marigold cultivars: *а* – “Geisha”; *б* – “Mahrovy 2000”; *в* – “Dragon”; *г* – “Prince of India”

Принц Индии – высота – 60 см. Соцветия черепитчатой формы. Язычковые лепестки ярко-оранжевые сверху, коричнево-красные с оборотной стороны. Сорт универсального использования, пригоден для срезки.

Сырье выращивали на экспериментальном участке отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». Соцветия сорта «Махровый 2000» собирали в июле месяце 2013–2016 гг., остальных сортов – в 2016 г. Сырье высушивали до воздушно-сухого состояния и хранили в темноте, а затем измельчали в агатовой ступке, либо в кофемолке. Экстракцию осуществляли как дистиллированной (H_2O), так и дейтерированной водой (D_2O) в соотношении растительное сырье : экстрагент = 1:15. Отфильтрованный экстракт в первом случае помещали во вкладыш с внешним диаметром 3,8 мм и запаивали, а во втором – непосредственно в ампулу ЯМР. В раствор переходило ~ 15 % от массы воздушно-сухого вещества.

Спектры ЯМР водных растворов зарегистрированы на спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочей частотой 500, 126 и 202 МГц для ядер ^{1}H, ^{13}C и ^{31}P соответственно при температуре 293 К. В качестве внутреннего стандарта использовали добавленный в раствор *трет*-бутиловый спирт, для протонов метильных групп которого химический сдвиг $\delta\ (CH_3)_3 = 1{,}24$ м.д., а для ядер ^{13}C – $\delta\ (CH_3)_3 = 30{,}29$ м.д. Для ядер ^{31}P химические сдвиги регистрировали относительно ортофосфорной кислоты (H_3PO_4, $\delta = 0$ м.д.). Запись проводили как с подавлением протонного взаимодействия, так и без подавления. В случае использования дистиллированной воды в качестве экстрагента между стенками вкладыша и ампулы ЯМР для осуществления дейтронной стабилизации вносили дейтеробензол (C_6D_6). Запись спектров осуществляли в «количественном» режиме. Протонные и фосфорные спектры накапливались в течение 10 мин, а углеродные – 12 ч. Все экспериментальные данные получены и обработаны с помощью пакета программ XWIN – NMR 3.5. Для идентификации соединений в экстрактах в аналогичных условиях записаны спектры ряда индивидуальных аминокислот и сахаров.

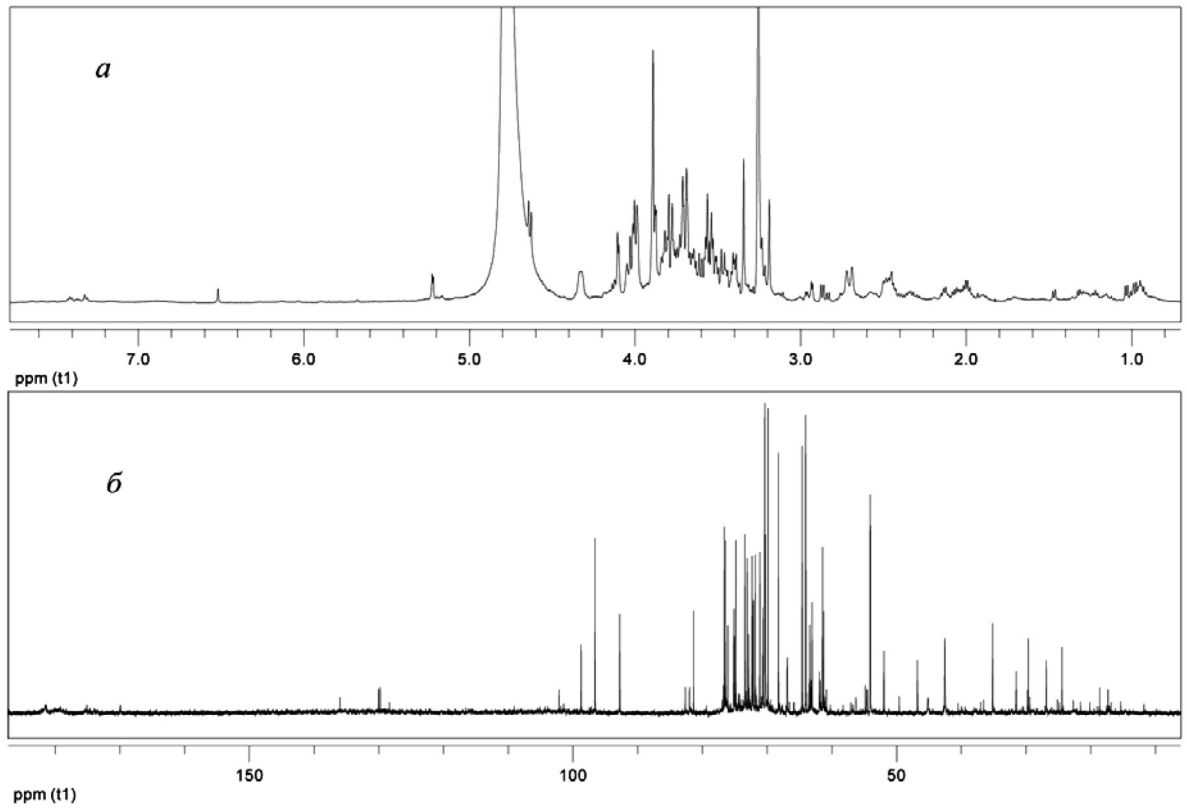


Рис. 2. ЯМР спектры 1H (*а*) и 13C (*б*) водных (D_2O) экстрактов соцветий календулы сорта «Гейша»

Fig. 2. NMR spectra of the 1H (*a*) and 13C (*б*) aqueous (D_2O) extracts of the “Geisha” pot marigold inflorescence

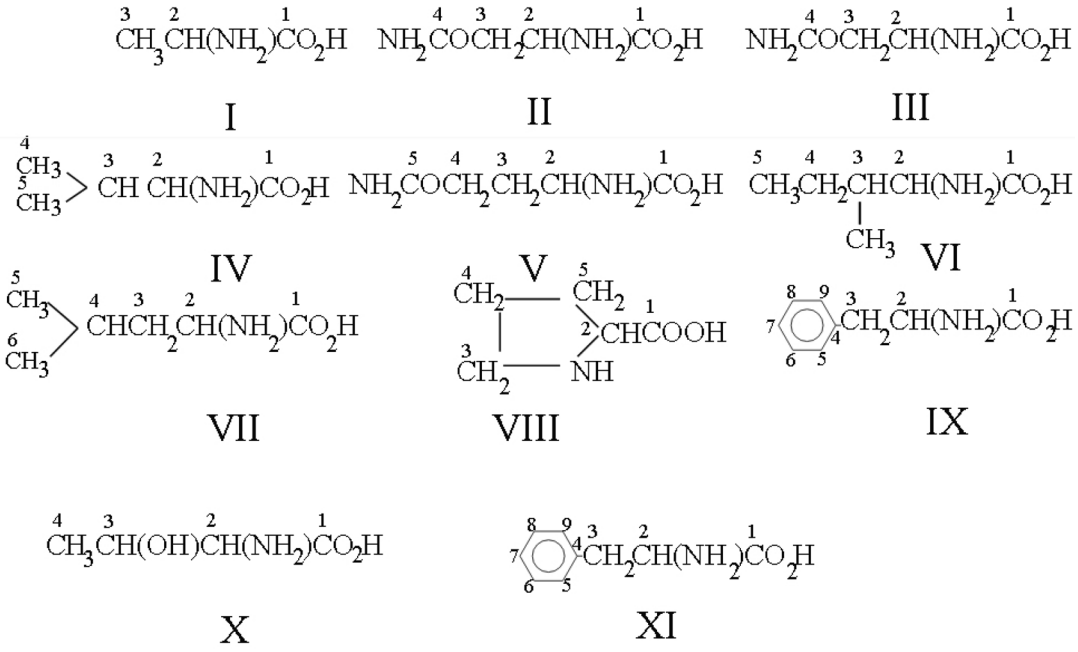


Рис. 3. Структурные формулы аминокислот водных экстрактов календулы

Fig. 3. Structure formulas of pot marigold aqueous extract aminoacids

Результаты и их обсуждение. В результате исследований установлены качественный и количественный составы водных экстрактов изучаемых сортов. На рис. 2 приведены спектры 1H (*а*) и 13C (*б*) водных (D_2O) экстрактов цветков календулы сорта «Гейша».

Отмечено, что экстракты, полученные с использованием различных экстрагентов из соцветий разных урожаев сорта «Махровый 2000» по количеству идентифицированных соединений отличаются незначительно. А значит, условия вегетационного периода и хранения не оказывают явного негативного влияния на качество растительного сырья календулы.

В исследованных образцах обнаружены следующие аминокислоты: аланин (I), γ-аминомасляная кислоты (II), аспарагин (III), валин (IV), глутамин (V), изолейцин (VI), лейцин (VII), пролин (VIII), тирозин (IX), треонин (X) и фенилаланин (XI). На рис. 3 показаны структурные формулы этих аминокислот.

Кроме того, в растворах присутствуют моносахариды – глюкоза и фруктоза. Известно [4], что фруктоза в водных экстрактах существует в виде пяти конформеров. Из-за малой концентрации и большого количества сигналов аминокислот удалось идентифицировать только три мажорных компонента: β-фруктопираноза (XII), β-фруктофуроноза (XIII) и α-фруктофураноза (XIV) (рис. 4, *а*) В отличие от фруктозы глюкоза в водном растворе присутствует в виде двух изомеров: β-глюкопиранозы (XV) и α-глюкопиранозы (XVI) (рис. 4, *б*) [5].

Кроме того, в заметных количествах в водном экстракте календулы присутствуют соединения, содержащие метоксигруппы (^{1}H, δ м.д. = 3,26, 3,35; ^{13}C, δ м.д. = 54,01, 54,04, 54,07). Эти группы, по-видимому, связаны с молекулами сахаров (^{13}C, δ м.д. = 66,86; 70,47; 71,12; 71,82; 72,16; 72,86; 73,09; 73,43; 75,04). Для идентификации этих соединений необходимо выделение их из экстракта, что на данный момент не представляется возможным.

Анализ спектров на ядрах ^{31}P показал, что в водном экстракте цветков календулы в заметных количествах присутствуют и фосфаты: δ = 0,11 м.д.

Данные о химических сдвигах идентифицированных аминокислот и углеводов представлены в табл. 1 и 2.

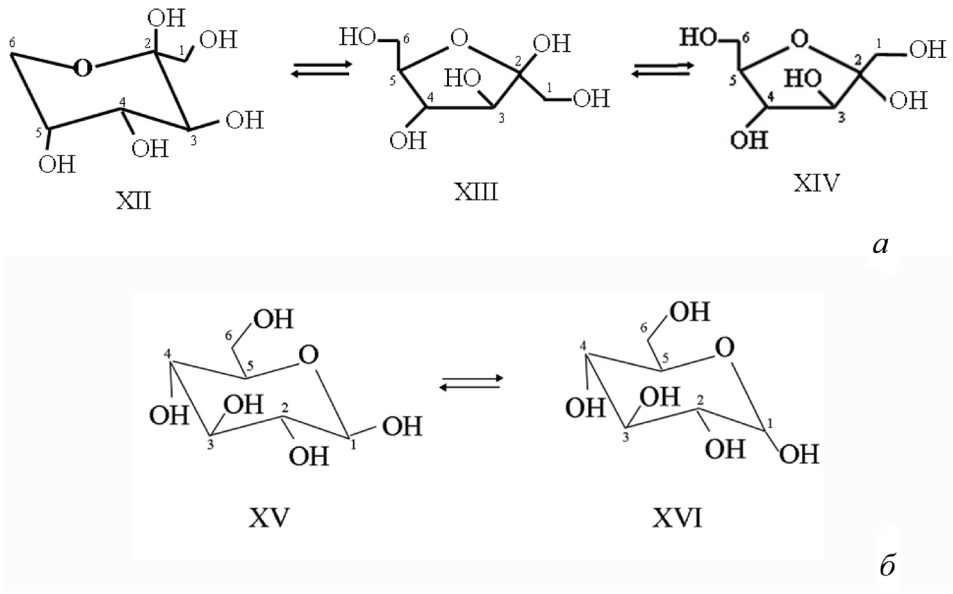


Рис. 4. Структурные формулы преобладающих моносахаридов водных экстрактов календулы: *а* – изомеры фруктозы; *б* – изомеры глюкозы

Fig. 4. Structure formulas of the prevailing monosaccharides in the aqueous extracts of pot marigold: *а* – fructose isomers; *б* – glucose isomers

Таблица 1. **Химические сдвиги (δ м.д.) ядер ^{1}H и ^{13}C аминокислот (АК) D_2O экстрактов соцветий календулы**

Table 1. **Chemical shifts (δ м.д.) of the ^{1}H and ^{13}C nuclei of aminoacids (АК) of the D_2O pot marigold inflorescence extracts**

АК	C(1)	C(2)	C(3)	C(4)	C(5)	C(6)	C(7)	C(8)	C(9)
^{1}H									
I		3,77	1,47						
II		2,29	1,90	3,01					
III		4,00	2,85; 2,94						
IV		3,60	2,27	1,04	0,99				
V		3,77	2,13	2,41; 2,47					
VI		3,66	1,98	1,27; 1,47	0,93	1,00			
VII		3,72	1,72	1,72	0,96	0,95			
VIII		4,12	3,35; 3,43	2,01	2,05; 2,34				
IX		3,93	3,07; 3,18		7,18	6,88		6,88	7,18
X		3,58	4,25	1,33					
XI		3,98	3,12; 3,28		7,32	7,42	7,36	7,42	7,32
^{13}C									
I	176,44	51,14	16,80						
II	181,73	35,00	24,20	39,85					
III	173,92	51,91	35,12	175,06					
IV	174,64	60,93	29,65	18,57	17,21				
V	174,59	54,80	26,84	31,48	178,24				
VI	174,63	60,14	36,46	25,03	11,69	15,27			
VII	176,28	54,10	40,49	24,85	22,72	21,55			
VIII	174,92	61,63	46,48	24,21	29,42				
IX	174,66	56,78	36,17	157,52	131,44	116,52	155,57	116,52	131,44
X	173,28	61,00	66,46	20,06					
XI	174,39	56,64	36,95	135,67	129,95	129,70	128,27	129,70	129,95

Таблица 2. **Химические сдвиги (δ м.д.) ядер ^{1}H и ^{13}C изомеров фруктозы и глюкозы D_2O экстрактов соцветий календулы**

Table 2. **Chemical shifts (δ м.д.) of the ^{1}H and ^{13}C nuclei of fructose and glucose isomers of the D_2O pot marigold inflorescence extracts**

Изомер	C(1)	C(1')	C(2)	C(3)	C(4)	C(5)	C(6)	C(6')
^{1}H								
XII	3,70	3,55		3,79	3,88	3,98	4,01	3,69
XIII	3,58	3,54		4,10	4,10	3,83	3,79	3,66
XIV	3,66	3,63		4,09	3,98	4,05	3,80	3,68
XV	4,63		3,24	3,46	3,40	3,45	3,89,	3,71
XVI	5,22		3,52	3,69	3,41	3,81	3,80	3,75
^{13}C								
XII	64,56		98,74	68,23	70,36	69,88	64,03	
XIII	69,05		102,16	76,06	75,12	81,35	63,05	
XIV	63,31		105,12	82,65	76,63	81,98	61,76	
XV	96,59		74,82	76,44	70,28	76,63	61,43	
XVI	92,77		72,11	73,43	70,36	72,33	61,27	

Результаты нашего исследования хорошо коррелируют с литературными данными для химических сдвигов сахаров [4, 5] и аминокислот [6].

В результате количественной обработки спектров определено содержание компонентов водных экстрактов соцветий календулы различных сортов, которые представлены в табл. 3.

Таблица 3. **Содержание аминокислот и сахаров в водном экстракте (D_2O) соцветий календулы разных сортов (моль%)**

Table 3. **Aminoacids and sugars content in an aqueous extract (D_2O) of the different varieties of pot marigold inflorescence (mol. %)**

Название	Махровый 2000				Гейша 2016 г.	Дракон 2016 г.	Принц Индии 2016 г.
	2013 г.	2014 г.	2015 г.	2016 г.			
Аланин	1,0	0,9	0,8	0,5	0,9	1,3	1,0
γ-аминомасляная кислота	2,2	1,3	0,8	1,3	2,6	2,0	2,3
Аспарагин*	4,8	3,6	2,7	3,2	5,6	16,1	6,2
Валин*	1,1	1,1	1,1	0,5	1,2	2,0	1,3
Глутамин	3,1	3,1	2,2	1,3	3,1	4,3	3,8
Изолейцин*	0,9	0,9	0,5	0,6	0,8	1,3	0,7
Лейцин*	0,9	0,9	0,4	0,6	1,1	1,4	0,9
Пролин	6,8	7,7	6,1	10,2	6,7	6,7	8,3
Тирозин	0,3	0,5	0,5	0,2	0,3	0,3	0,5
Треонин*	0,8	0,8	0,7	0,2	1,0	1,4	1,0
Фенилаланин*	1,0	0,9	1,0	0,6	1,1	1,2	0,7
Сумма кислот	22,9	21,7	16,8	19,2	24,4	38,0	26,7
β-фруктопираноза	21,9	21,7	22,7	24,4	19,5	6,1	15,9
β-фруктофураноза	7,2	7,1	7,4	7,9	6,4	2,0	5,2
α-фруктофураноза	2,0	2,0	2,1	2,2	1,8	0,6	1,4
β-глюкопираноза	3,8	4,6	6,6	9,7	7,8	4,9	6,5
α-глюкопираноза	2,5	3,1	4,4	6,5	5,2	3,3	4,4
Сумма сахаров	37,4	38,5	43,2	50,5	40,7	16,36	33,4

Примечание. * Незаменимые аминокислоты.

Установлено, что сумма идентифицированных соединений составляет ~ 60 моль. %. Анализ полученных экспериментальных данных показал, что наиболее представительными аминокислотами в соцветиях календулы являются пролин и аспарагин, а из моносахаридов – фруктозы. Достаточно высокое суммарное содержание аминокислот в водных экстрактах календулы позволяет рассматривать ее как перспективное средство для использования при заболеваниях, сопро-

вождающихся белковой недостаточностью, с целью улучшения метаболических и репаративных процессов в послеоперационном периоде, для лечения травм, ожогов, параличей, диареи, поражений печени [7].

Заключение. Таким образом, показано, что сорта календулы «Гейша», «Махровый 2000», «Принц Индии» имеют сходный качественный и количественный составы углеводов и сахаров. Спектрально отличаются экстракты сорта «Дракон», в пуле аминокислот которого преобладает аспарагин, а содержание β-фруктопиранозы понижено по сравнению с другими сортами, что, вероятно, можно объяснить различным строением цветка, а именно преобладанием трубчатых лепестков в соцветии данного сорта и в связи с этим увеличением различных биологически активных веществ. Такая зависимость была показана ранее авторами [8] для распределения каротиноидов, флавоноидов и эфирных масел в соцветиях календулы. В целом для этого сорта характерно преобладание белкового метаболизма над углеводным, в отличие от других исследованных сортов.

Показано, что в водных экстрактах соцветий календулы содержатся важные для человека аминокислоты, что обуславливает широкий спектр фармакологической активности водных настоев календулы. Установлено достаточно высокое содержание моносахаридов с преобладанием β-фруктопиранозы, определяющих хорошие органолептические свойства травяных сборов с календулой.

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. Muney, B. P. Phytochemical Compostituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review / B. P. Muney, S. S. Khadabadi, N. B. Banarase // Tropical Jornal of Pharmaceutical Research. – 2009. – Vol. 8(5). – P. 455–465.

2. Специализированный кадастр растений, животных, грибов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http:// bchemcad.basnet.by/plants.php. [дата обращения: 25.08.2016].

3. ЯМР-спектроскопия в исследовании водных экстрактов травы пожитника греческого (*Trigonella foenum graecum* L.) / Е. Д. Агабалаева [и др.] // Журн. прикл. спектроскопии. – 2014. – Т. 81, № 4. – С. 543–547.

4. Obcervation of the keto tautomer of d-fructose in D_2O using 1H NMR spectroscopy / T. Barclay [et al.] // Carbohydrate research. – 2012. – Vol. 347, № 1. – P. 136–141.

5. NMR spectra (1H, 13C) of glucosinolates / W. Curatolo [et al.] // Carbohydrate research. – 1983. – Vol. 112, № 2. – P. 297–300.

6. Yamaji, T. Welcome to Spectral Database for Organic Compounds, SDBS [Электронный ресурс] / T. Yamaji. – Режим доступа: http:// sdbs.db.aist.go.jp. [Accessed: Feb.25, 2016].

7. Сафонова, И. А. Изучение аминокислотного состава пузыреплодника калинолистного (*Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim). [Электронный ресурс] / И. А. Сафонова. – Режим доступа: http://cyberleninka.ru/article/n/ izuchenie-aminokislotnogo-sostava-puzyreplodnika-kalinolistnogo-physocarpus-opulifolius-l-maxim [дата обращения 25.08.2016].

8. Исмагилов, Р. Р. Календула / Р. Р. Исмагилов, Д. А. Костылев. – Уфа: БГАУ, – 2000. – 102 с.

References

1. Muney B. P., Khadabadi S. S., Banarase N. B., “Phytochemical Compostituents and Pharmacological Activities of Calendula officinalis Linn (Asteraceae): A Review”, *Tropical Jornal of Pharmaceutical Research*, 2009, vol. 8(5), pp. 455–465.

2. “Specialized cadastre of plants, animals, mushrooms”, Available at: http://bchemcad.basnet.by/plants.php, (accessed 25.08.2016).

3. Agabaliaeva E. D., Karankevich E. G., Matveichuk S. V., Reshetnikov V. N., Skakovskii E. D., Tychinskaia L. Iu., “NMR spectroscopy of aqueous extracts of fenugreek (Trigonella foenum graecum L.)”, *Zhurnal prikladnoi spektroskopii* [Journal of Applied Spectroscopy (JAS)], 2014, vol. 81, no. 4, pp. 543–547.

4. Barclay T., Ginic-Markovic M., Johnston M. R., Cooper P., Petrovsky N., “Obcervation of the keto tautomer of d-fructose in D_2O using 1H NMR spectroscopy”, *Carbohydrate research*, 2012, vol. 347, no. 1, pp. 136–141.

5. Curatolo W., Neuringer L. J., Ruben D., Haberkorn R., “Two-dimensional J-resolved 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy of α,β-d-glucose at 500 MHz”, *Carbohydrate research*, 1983, vol. 112, no. 2, pp. 297–300.

6. Yamaji, T. “Welcome to Spectral Database for Organic Compounds, SDBS”, Available at: http://sdbs.db.aist.go.jp, (accessed Feb.25, 2016).

7. Safonova I. A., “A study of the amino acid composition of the Pacific ninebark (Physocarpus opulifolius (L.) Maxim)”, Available at: http://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-aminokislotnogo-sostava-puzyreplodnika-kalinolistnogo-physocarpus-opulifolius-l-maxim, (accessed 25.08.2016).

8. Ismagilov R. R., Kostylev D. A., *Kalendula* [Calendula], BGAU, Ufa, RU, 2000.

Информация об авторах

Шиш Светлана Николаевна – науч. сотрудник, Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svetlana.shysh@gmail.com.

Шутова Анна Геннадьевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna_shutova@mail.ru.

Скаковский Евгений Доминикович – канд. хим. наук, зав лаб., Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sed@ifoch.bas-net.by.

Тычинская Людмила Юльевна - канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tychinlyu@gmail.com.

Information about the authors

Sviatlana N. Shysh – Researcher, Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svetlana.shysh@gmail.com.

Hanna G. Shutava – Ph. D. (Biology), Leading Scientist, Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna_shutova@mail.ru.

Evgenii D. Skakovskii – Ph. D. (Chemistry), Head of Laboratory, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sed@ifoch.bas-net.by.

Ludmila Y. Tychinskaya – Ph. D. (Chemistry), Leading Scientist, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tychinlyu@gmail.com.

ISSN 1561-8331(print.)

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

ORGANIC CHEMISTRY

UDC 547.333.4.057

Поступила в редакцию 30.05.2017
Received 30.05.2017

Ya. B. Akayeu

Belarusian State University, Minsk, Belarus

SYNTHESIS OF NEW HIGHLY LYPOPHILIC ETHOXYLATED IONIC LIQUIDS AS PROMISING ACTIVE COMPONENTS FOR ION SELECTIVE ELECTRODES

Abtract: The convenient method for preparation of ethoxylated highly lipophilic quaternary ammonium salts has been developed, including alkylation of methyl gallate with dodecyl bromide, hydride reduction of ester group, introduction of the polyethoxylated fragment into the side chain, substitution of the terminal hydroxy group by chlorine and quaternization by a tertiary amine. The salts prepared possess the properties of ionic liquids and can be of interest as active components for ion selective electrode membranes.

Keywords: quaternary ammonium salts, ethoxylated, ionic liquids, ion exchanging membrane components, ion selective electrodes

For citation: Akayeu Ya. B. Synthesis of new highly lypophilic ethoxylated ionic liquids as promising active components for ion selective electrodes. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 53–57.

Е. Б. Окаев

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

СИНТЕЗ НОВЫХ ВЫСОКОЛИПОФИЛЬНЫХ ЭТОКСИЛИРОВАННЫХ ИОННЫХ ЖИДКОСТЕЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫХ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ МЕМБРАН ИОНОСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Аннотация: Разработан удобный метод получения этоксилированных высоколипофильных четвертичных аммониевых солей, включающий алкилирование метилгаллата додецилбромидом, гидридное восстановление сложноэфирной группы, введение полиэтоксилированного фрагмента в состав боковой цепи, замещение концевой гидроксильной группы на атом хлора и кватернизацию полученного галогенпроизводного третичным амином. Синтезированные соли обладают свойствами ионных жидкостей и представляют интерес в качестве электроактивных веществ.

Ключевые слова: четвертичные аммониевые соли, этоксилированные, ионные жидкости, электроактивные вещества, ионоселективные электроды

Для цитирования: Окаев, Е. Б. Синтез новых высоколипофильных этоксилированных ионных жидкостей – перспективных активных компонентов мембран ионоселективных элктродов / Е. Б. Окаев // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 53–57.

Introduction. Quaternary ammonium salts have been for a long time used as anion exchanger components of ion selective electrode membranes [1]. According to the previously dominating viewpoint, they are generally considered to have low selectivity, due to nonspecific nature of their interaction with various anions. This viewpoint, however, has been considerably revised during last two decades; in particular, it has been shown [2–5] that some quaternary ammonium salts bearing methyl groups at their cation center and so having improved steric accessibility thereof, can possess increased selectivity to certain kinds of anions (Fig. 1). The methods for relatively simple and easily scalable preparation of such salts have been described [6].

© Akayeu Ya. B., 2017

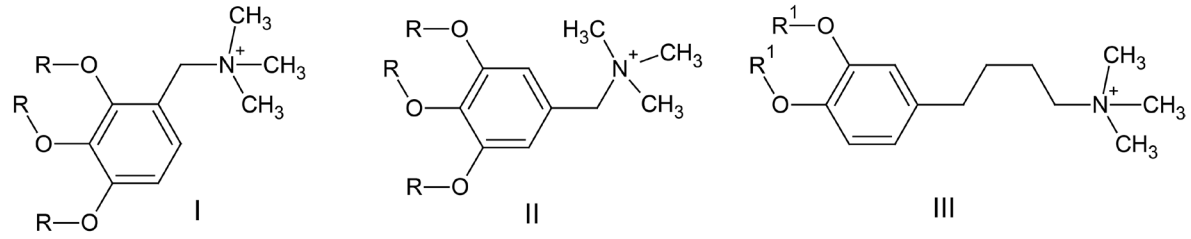


Fig. 1. Highly lipophilic quaternary ammonium salts with improved steric accessibility of the cation center (R = n-$C_{12}H_{25}$, R^1 = *n*-$C_{16}H_{33}$)

However, steric access to the cationic nitrogen atom of these salts may still not be as good as it seems, due to the possibility of long alkyl chains wrapping around the ammonium fragment. This may be particularly true for the structure **I** that has a C_{12} alkoxy chain attached in the position adjacent to the benzyl carbon bearing the ammonium cation, but the same can be a problem for the structure **II** as well. The evidence of this is that for compound **III** where nitrogen atom is attached by a longer carbon chain, some increase of selectivity has been observed [7]. At the same time, trying to improve it further by introducing longer carbon chains between aromatic ring and cationic nitrogen does not seem a feasible approach, due to the lack of conformational stability for non-functionalized chains and, therefore, high probability of their wrapping. Introducing instead, for instance, a relatively rigid polyene fragment is also unpractical due to decreased stability of the compound toward polymerization and oxidation. Additionally, these structural changes make the preparative route to the desired structures much more lengthy and expensive.

Therefore, another approach has been chosen, with a chain of several oxyethane groups inserted as a spacer for removing the aromatic ring from the quaternary ammonium center. In addition to being inexpensive and involving relatively small number of additional synthetic steps, this approach has also the advantage of putting greater distance between the nitrogen atom and the aromatic ring, due to known ability of poly(oxyethane) chains to maintain relatively unfolded, helical or even wholly anti-periplanar conformations [8, 9]. This gave us a hope to expect better steric access to the ammonium center for these products.

Results and discussion. The synthetic route applied has been based on the previously developed method, used formerly for preparation of salt **II** and structurally related compounds [6]. The commercially available reagent, gallic acid methyl ester **IV** (Fig. 2), has been alkylated with dodecyl bromide using slightly modified procedure from [6]. Instead of purification by multiple recrystallization, that could be very laborious and time consuming, particularly when used on large amounts of substance, the product **V** has been purified from phenolic compounds (formed due to incomplete alkylation) by extraction of its heptane solution with potassium hydroxide 5% solution in slightly watered *iso*-propyl alcohol. After this procedure, compound **V** has been found to be pure enough to be used in the next step without further purification.

The ester **V** was then converted into the substituted benzyl chloride **VII** by the two-step procedure taken also from [6]. Enlargement of the side chain has been effected by the reaction with lithium salts of di-, tri- and tetraethylene glycol, respectively, affording compounds **VIII *a-c*** in good yields. The next two steps have been performed as an one-pot procedure, without isolating and characterizing the intermediate alkyl chlorides. Final products **IX *a-c*** were obtained in good to moderate yields as white or off-white crystalline solids with melting points well below 100 ºC (in the case of compound **IX *c***, the m.p. is close to room temperature), that makes them, by definition, ionic liquids. Their structures have been confirmed by ^{1}H NMR and IR spectroscopy.

The preliminary data (to be published elsewhere soon) on ion selectivity of electrodes using compounds **IX** as active components, provide the evidence that their selectivities toward double-charged anions tend to improve with the spacer length increase, as compared to the compound **II** containing no spacer at all.

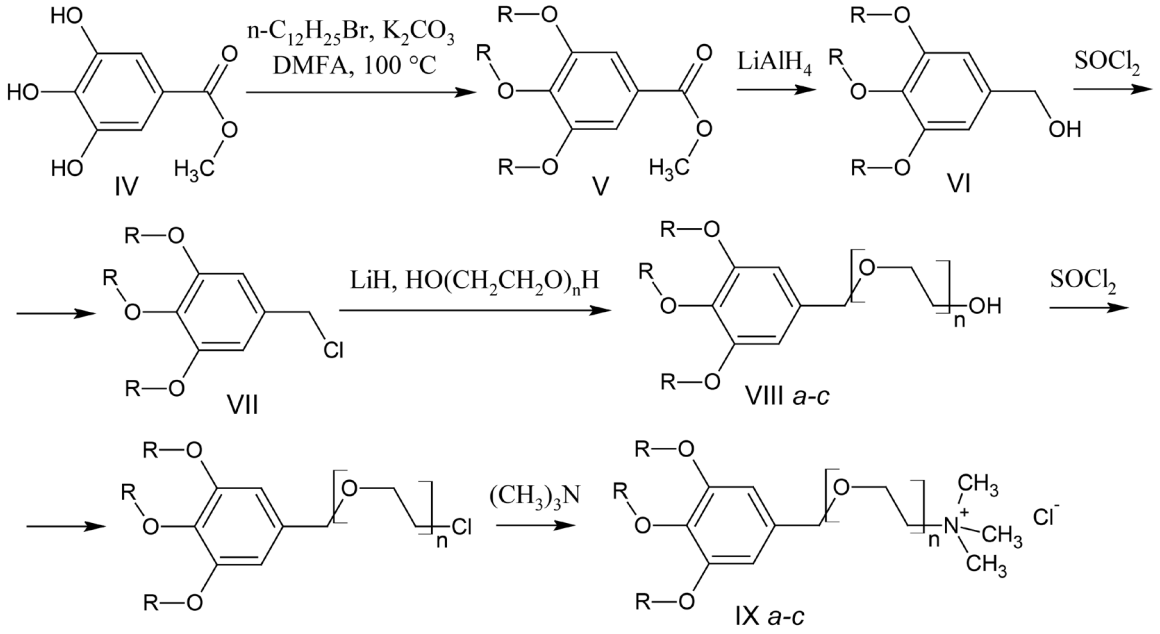


Fig. 2. Synthesis of oligoethoxylated quaternary ammonium salts (R = $C_{12}H_{25}$, n = 2, 3 or 4 for *a*, *b* and *c*, respectively)

Conclusion. We report here the synthetic procedure for preparation of highly lipophilic ethoxylated quaternary ammonium salts as promising ionic liquid components for ion-selective electrode membranes. The procedure developed is convenient, relatively easy to follow and allows wide-range variability of the spacer length, therefore providing a good tool for investigating the effects of the cationic center steric accessibility upon the selectivity of anion exchange extraction.

Experimental. Gallic acid methyl ester (compound **IV**) and dodecyl bromide have been purchased from Acros Organics and had the reagent grade of purity. The reactions were monitored by TLC on Silufol or Kieselgel 60 F_{254} plates. Melting pounts have been determined by the capillary method and are uncorrected. IR spectra were recorded on Bruker ALPHA spectrometer by attenuated total reflection method (ATR Di) in the range from 4000 to 400 cm^{-1}. ^1H NMR (500.03 MHz) spectra were recorded on a Bruker AVANCE-500 NMR spectrometer. $CDCl_3$ was used as a solvent and the residual solvent signals (δ 7.26 ppm) served as an internal reference standard.

3,4-5-tris-Dodecyloxybenzoic acid methyl ester (**V**). To a solution of 18.42 g (0.1 mol) of methyl gallate **IV** in 500 mL of dimethylformamide, 48.30 g (0.35 mol) of potassium carbonate and 74.4 mL (0.31 mol) of dodecyl bromide have been added. The mixture was heated at 100°C with vigorous stirring under reflux for 4 h, then cooled down to room temperature and diluted with 500 mL of heptane. Inorganic salts were filtered off and the filtrate diluted with 500 mL of water. After separation of layers, the lower phase was extracted with heptane (3×100 mL). The combined heptane solution was then extracted with small portions of 5% solution of potassium hydroxide in the *iso*-propyl alcohol-water (9:1) mixture until the alkaline layer was no more turning brown after the extraction. The heptane layer was then washed with water, dried and evaporated, the residue crystallized from *iso*-propyl alcohol affording 61.35 g of compound **V** (yield 89%), with physical constants, IR and NMR ^1H spectra being in accordance with published data [6].

(3,4-5-tris-Dodecyloxyphenyl)methanol (**VI**). To a suspension of 1.10 g (0.029 mol) of lithium aluminium hydride in 200 mL of dry tetrahydrofurane (distilled over lithium hydride), a solution of 10.00 g (0.0145 mol) of the compound **V** in 100 mL of the same solvent has been added dropwise with stirring. The reaction mixture was then refluxed for 2 h, cooled down and treated with 1 mL of NH_4Cl saturated water solution. The inorganic salts were filtered off, the resulting solution dried and evaporated, affording a crude product that has been recrystallized from iso-propyl alcohol giving 8.82 g of compound **VI** (yield 92%) with physical constants, IR and NMR ^1H spectra being in accordance with published data [6].

(3,4-5-tris-Dodecyloxyphenyl)chloromethane (**VII**). To a solution of 6.61 g (0.01 mol) of the compound **VI** in 30 ml of dichloromethane, 1.45 mL (0.02 mol) of freshly distilled thionyl chloride has been added dropwise. The solution was then refluxed for ca. 2 h until no starting material has been detected by TLC, evaporated to dryness, evacuated for a while to remove traces of acidic compounds, and the residue crystalized from acetone, giving 5.71 g (yield 84%) of the product, with physical constants, IR and NMR ^{1}H spectra being in accordance with published data [6].

2-{2-[(3,4,5-tris-dodecyloxybenzyl)oxy]ethoxy}ethanol (**VIII *a***)*, 2-(2-{2-[(3,4,5-tris-dodecyloxybenzyl)oxy]ethoxy}ethoxy)ethanol* (**VIII *b***) *and 2-(2-(2-{2-[(3,4,5-tris-dodecyloxybenzyl) oxy]ethoxy}ethoxy) ethoxy)ethanol* (**VIII *c***).

Into a round-bottom flask, well dried and protected from atmospheric moisture, 0.5 g of lithium hydride, 5,0 mL of dry tetrahydrofurane and 5.0 mL of di-, tri or tetraethylene glycol, respectively, were added (careful, vigorous hydrogen evolution and foaming!). The mixture was refluxed until no more hydrogen evolved, and 15 ml of the compound **VII** (1.00 g, 1.47 mmol) solution in tetrahydrofurane was introduced. The mixture was then refluxed until no more starting material has been detected by TLC, cooled down to room temperature, diluted by water and extracted with dichloromethane. The combined dichloromethane extracts were washed with water, dried and evaporated, giving compounds **VIII *a-c*** as yellowish or yellow oils, sufficiently pure (TLC) to be introduced into the next step without further purification. The yields at this step have not been determined.

Compound **VIII *a***. IR, cm^{-1}: 3397 (broad, OH), 2963, 2917, 2870, 2847 (CH), 1592 (C=C$_{ar}$). NMR ^{1}H: 0.88 (t, 9H, J = 6.0 Hz, CH_3), 1.26 (m, broad, 48H, CH_2), 1.45 (m, 6H, CH_2), 1,75 (m, 6H, CH_2), 3,63 (m, 4H, OCH_2), 3,72 (m, 4H, OCH_2), 3,95 (m, 7H, OCH_2+OH), 4.47 (m, 2H, m, $C_{arom}CH_2$), 6.53 (s, 2H, $C_{arom}H$).

Compound **VIII *b***. IR, cm^{-1}: 3357 (broad, OH), 2952, 2918, 2870, 2848 (CH), 1592 (C=C$_{ar}$). NMR ^{1}H: 0.88 (t, 9H, J = 6.0 Hz, CH_3), 1.27 (m, broad, 48H, CH_2), 1.47 (m, 6H, CH_2), 1,77 (m, 6H, CH_2), 3,62 (m, 6H, OCH_2), 3,74 (m, 6H, OCH_2), 3,95 (m, 7H, OCH_2+OH), 4.47 (m, 2H, m, $C_{arom}CH_2$), 6.53 (s, 2H, $C_{arom}H$).

Compound **VIII *c***. IR, cm^{-1}: 3383 (broad, OH), 2957, 2918, 2850 (CH), 1586 (C=C$_{ar}$). NMR ^{1}H: 0.88 (t, 9H, J = 6.0 Hz, CH_3), 1.26 (m, broad, 48H, CH_2), 1.47 (m, 6H, CH_2), 1,76 (m, 6H, CH_2), 3,68 (m, 13H, OCH_2+OH), 3,95 (m, 6H, OCH_2), 4.46 (m, 2H, m, $C_{arom}CH_2$), 6.53 (s, 2H, $C_{arom}H$).

N,N,N-trimethyl-2-{2-[(3,4,5-tris-dodecyloxybenzyl)oxy]ethoxy}ethanaminium chloride (**IX *a***)*, N,N,N-trimethyl-2-(2-{2-[(3,4,5-tris-dodecyloxybenzyl)oxy]ethoxy}ethoxy)ethanaminium chloride* (**IX *b***)*, N,N,N-trimethyl-2-(2-(2-{2-[(3,4,5-tris-dodecyloxybenzyl) oxy]ethoxy}ethoxy) ethoxy)ethanaminium chloride* (**IX *c***).

To a solution of compounds **VIII *a, b*** or ***c,*** taken directly from the synthesis described above, in 10 mL of dichloromethane, 0.5 mL of freshly distilled thionyl chloride has been added. The solution was then refluxed for ca. 2 h until no starting material has been detected by TLC, evaporated to dryness, evacuated for a while to remove traces of acidic compounds, and the residue, without isolation or purification, was treated with 10 ml of approx. 2.1 M solution of trimethylamine in *iso*-propyl alcohol. The solution was kept at room temperature for 48 hours, then cooled down to 0 ºC, and the crystals precipitated were collected, washed with the minimum amount of *iso*-propyl alcohol and recrystallized from the same solvent, giving, respectively, 0.51 g (42%) of the compound **IX *a***, 0.60 g (47%) of the compound **IX *b*** and 0.54 g (40%) of the compound **IX *c***, all yields being calculated for three steps, starting from the compound VII.

Compound **IX *a***. White solid, m.p. 41-42ºC. IR, cm^{-1}: 2961, 2927, 2874, 2847 (CH), 1590 (C=C$_{ar}$). NMR ^{1}H: 0.88 (t, 9H, J = 6.0 Hz, CH_3), 1.30 (m, broad, 48H, CH_2), 1.47 (m, 6H, CH_2), 1,70 (m, 6H, CH_2), 2,84 (s, broad, 9H, $N(CH_3)_3$), 3,63 (m, 2H, OCH_2), 3,77 (m, 2H, OCH_2), 3.94 (m, 10H, OCH_2+NCH_2), 4.51 (s, 2H, $C_{arom}CH_2$), 6.56 (s, 2H, $C_{arom}H$).

Compound **IX *b***. White solid, m.p. 50–51 ºC. IR, cm^{-1}: 2952, 2918, 2870, 2848 (CH), 1592 (C=C$_{ar}$). NMR ^{1}H: 0.89 (t, 9H, J = 6.0 Hz, CH_3), 1.26 (m, broad, 48H, CH_2), 1.46 (m, 6H, CH_2), 1,73 (m, 6H, CH_2), 2,85 (s, broad, 9H, $N(CH_3)_3$), 3,63 (m, 4H, OCH_2), 3,77 (m, 4H, OCH_2), 3.94 (m, 10H, OCH_2+NCH_2), 4.50 (s, 2H, $C_{arom}CH_2$), 6.56 (s, 2H, $C_{arom}H$).

Compound **IX *c***. Yellowish solid, m.p. 29–32 ºC (liquid cryslal formation), 109 ºC (clearing temperature). IR, cm^{-1}: 2957, 2918, 2850 (CH), 1588 (C=C_{ar}). NMR ^{1}H: 0.89 (t, 9H, J = 6.0 Hz, CH_3), 1.26 (m, broad, 48H, CH_2), 1.45 (m, 6H, CH_2), 1,77 (m, 6H, CH_2), 2,85 (s, broad, 4H, CH_2) 3.37 (s, broad, 11H, $N(CH_3)_3$+OCH_2), 3,77 (m, 6H, OCH_2), 3,96 (m, 10H, OCH_2+NCH_2), 4.83 (m, 2H, m, $C_{arom}CH_2$), 6.78 (s, 2H, $C_{arom}H$).

Acknowledgements. The author is thankful to Ph. D. Yulia V. Matveichuk for the data on ion selectivity of electrodes based on compounds **IX *a-c***.

References

1. Bühlmann P., Pretsch E., Bakker E., "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors", *Chemical Reviews*, 1998, vol. 98, issue 4, pp. 1593–1688.

2. Egorov V., Rakhman'ko E., Okaev E., Nazarov V., Pomelyenok E., Pavlova, T., "Novel Anion Exchangers for Electrodes with Improved Selectivity to Divalent Anions", *Electroanalysis*, 2004, vol. 16, pp. 1459–1462.

3. Lomako S. V., Astapovich R. I., Nozdrin-Plotnitskaya O. V., Pavlova T. E., Shi Lei, Nazarov V. A., Okaev E. B., Rakhman'ko E. M., Egorov V. V., "Sulfate-selective electrode and its application for sulfate determination in aqueous solutions", *Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 562, issue 2, pp. 216–222.

4. Egorov V. V., Nazarov V. A., Okaev E. B., Pavlova T. E., "A new sulfate-selective electrode and its use in analysis", *Journal of Analytical Chemistry*, 2006, vol. 61, issue 4, pp. 382–388.

5. Egorov V. V., Lyaskovskii P. L., Taribo M. G., Nazarov V. A., Rahman'ko E. M., Stanishevskii L. S., Okaev E. B., "Influence of the nature of liquid anion exchanger on the selectivity of anion selective electrodes", *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 65, issue 11, pp. 1181–1190.

6. Okaev E. B., "Synthesis of novel highly lipophylic quaternary ammonium salts having controlled steric accessibility of their cationic center", *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi: Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2005, no. 1, pp. 53–57.

7. Rakhman'ko E. M., Matveichuk Iu. V., Iasinetskii V. V., Stanishevskii L. S., "The effect of a neutral carrier on performance of oxalate and sulfate-selective electrodes", *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi: Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2015, no. 2, pp. 19–24.

8. Pai S. S., Hammouda B., Hong K., Pozzo D. C., Przybycien T. M., Tilton R. D., "The Conformation of the Poly(ethylene glycol) Chain in Mono-PEGylated Lysozyme and Mono-PEGylated Human Growth Hormone", *Bioconjugate Chemistry*, 2011, vol. 22, issue 11, pp. 2317–2323.

9. Harder P., Grunze M., Dahint R., Whitesides G. M., Laibinis P. E., "Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption", *Journal of Physical Chemistry, Series B*, 1998, vol. 102, pp. 426–436.

Information about the authors

Yauhen B. Akayeu – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Scientist, Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: okaev1969@gmail.com.

Информация об авторах

Окаев Евгений Борисович – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник, Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: okaev1969@gmail.com.

ISSN 1561-8331(print.)
УДК 547.466.6; 615.225.2

Поступила в редакцию 14.06.2016
Received 14.06.2016

З. И. Куваева, Д. В. Лопатик, О. М. Бондарева, В. В. Сивчик

Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

СИНТЕЗ ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТ

Аннотация: Разработан процесс получения фосфорилированных аминокислот, представляющих интерес для использования в качестве фармацевтических субстанций нового класса эффективных лекарственных средств различного терапевтического действия. Процесс включает 3 стадии: N-ацетилирование аминокислот, получение аллиловых эфиров N-ацетилпроизводных аминокислот и фосфорилирование синтезированных эфиров путем присоединения диметилфосфита по двойной связи аллиловых групп. В результате образуются целевые соединения – 3-диалкоксифосфорил-1-пропиловые эфиры N-ацетилированных аминокислот. При осуществлении указанного процесса синтезированы и выделены фосфорилированные производные следующих аминокислот: глицина, β-аланина, γ-аминомасляной, L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислот. Установлено, что полнота конверсии аллилового эфира при действии диметилфосфита зависит от природы применяемой N-ацетиламинокислоты. Реакция фосфорилирования легко протекает при использовании аллиловых эфиров N-ацетилпроизводных монокарбоновых аминокислот – глицина, β-аланина и γ-аминомасляной кислоты. Диаллиловые эфиры вступают в реакцию значительно труднее, что, вероятно, связано с пространственными затруднениями при фосфорилировании двойных связей. Полученные фосфорилированные производные представляют интерес для использования в качестве потенциальных фармацевтических субстанций для нового класса эффективных лекарственных средств антигипоксического и кардиоваскулярного действия, а также корректоров патологий центральной нервной системы.

Ключевые слова: аминокислоты, глицин, β-аланин, γ-аминомасляная, L-аспарагиновая, L-глутаминовая, N-ацетилпроизводные, аллиловые эфиры, фосфорилирование, фармацевтические субстанции

Для цитирования: Синтез фосфорилированных аминокислот / З. И. Куваева [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 58–62.

Z. I. Kuvaeva, D. V. Lopatik, O. M. Bondareva, V. V. Sivchik

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

SYNTHESIS OF PHOSPHORILATED AMINO ACIDS

Abstract: Phosphorylated derivatives of amino acids: glycine, β-alanine, γ-aminobutyric, L-aspartic and L-glutamic acid have been synthesized. Phosphorylation reaction is carried out using dimethylphosphite on allyl ethers of N-acetyl derivatives of amino acids. Obtained phosphorylated amino acids are of interest for potential use as pharmaceutical substances for a new class of effective drugs.

Keywords: amino acids, L-aspartic acid, β-alanine, glycine, γ-aminobutiric acid, L-glutamic acid, N-acetyl derivatives, allyl ethers, phosphorylation, pharmaceutical substances

For citation: Kuvaeva Z. I., Lopatik D.V., Bondareva O. M., Sivchik V. V. Synthesis of phosphorylated amino acids. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 58–62 (In Russian).

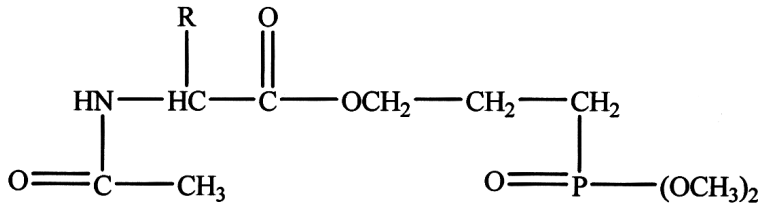
Перспективным направлением современной фармакологии является разработка новых лекарственных препаратов на основе аминокислот. Исследования в области синтеза производных аминокислот представляют большой практический интерес, так как открывают возможности получения новых эффективных лекарственных средств широкого профиля терапевтического действия.

Фосфорилирование является методом органического синтеза, применяемого для целенаправленного получения фосфорсодержащих производных аминокислот, обладающих ценными свойствами. Процессы фосфорилирования в живых клетках – одна из наиболее распространенных и важнейших биохимических реакций, регулирующих активность молекул белка.

Известен ряд патентов на получение и использование N-фосфорилированных производных α-аминокислот [1–3]. Так, например, описан способ синтеза N-фосфонометилглицина, пригодного для использования в качестве гербицидного средства [1]. Запатентованы композиции и соли на основе N-(фосфоноацетил)-L-аспарагиновой кислоты, обладающие широким спектром антивирусного действия [2, 3].

Производные аминокислот, содержащие фосфорилированные фрагменты при карбоксильной группе, привлекли внимание исследователей лишь в конце XX века [4]. Выяснилось, что эти соединения сочетают повышенную липофильность с хорошей растворимостью в воде, облегчающие их способность к проникновению через гистогематические барьеры. Они обладают высокой биологической активностью и являются потенциальными фармацевтическими субстанциями нового класса эффективных средств кардиоваскулярного, антигипоксического и психостимулирующего действия [4–11].

Фосфорилированные аминокислоты представляют собой 3-ди-алкоксифосфорил-1-пропиловые эфиры N-ацетилпроизводных аминокислот следующей структурной формулы:



Терапевтическая активность соединений зависит от строения аминокислотного радикала R и количества содержащихся в молекуле фосфорилированных фрагментов. Установлено, что фосфорилированное производное β-аланина обладает высокой антигипоксической активностью по сравнению с антигипоксическим препаратом сравнения пикамилоном. Это свойство позволяет рекомендовать средство на основе указанного производного β-аланина для профилактических целей при гипоксических состояниях организма, связанных с воздействием факторов, приводящих к тканевой гипоксии [8].

Введение в молекулу глицина фосфорилированного фрагмента приводит к повышению антигипоксической активности этой аминокислоты [5, 9, 10]. Фосфорилированные производные глицина и γ-аминомасляной кислоты вызывают длительное и значительное понижение уровня артериального давления, а ди-3-диметоксифосфорил-1-пропиловые эфиры N-ацетилпроизводных возбуждающих аминокислот L- и DL-глутаминовой проявляют прессорные эффекты [6, 7].

Сложные эфиры тормозных и возбуждающих аминокислот, содержащие диалкоксифосфорилалкильный заместитель непосредственно при карбоксильной группе, проявляют психостимулирующие свойства, наиболее выраженные у производных дикарбоновых аминокислот [6].

Цель работы – разработка условий синтеза и получение экспериментальных образцов фосфорилированных производных аминокислот – глицина, β-аланина, γ-аминомасляной, L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислот. Эти соединения представляют интерес для получения на их основе субстанций лекарственных средств широкого профиля терапевтического действия.

Несмотря на имеющиеся сведения об исследованиях терапевтического действия фосфорилированных аминокислот, в литературе практически отсутствуют описания условий их синтеза за исключением авторского свидетельства [6].

Нами был разработан процесс синтеза О-фосфорилированных аминокислот, включающий следующие основные стадии [12]: 1-я – получение N-ацетилпроизводных исходных аминокислот; 2-я – синтез аллиловых эфиров N-ацетилпроизводных аминокислот; 3-я – фосфорилирование аллиловых эфиров N-ацетилпроизводных аминокислот действием диметилфосфита.

Получение N-ацетилпроизводных аминокислот не вызывает трудностей. Отработаны препаративные методики их синтеза. Они уже нашли практическое применение для фармацевтических целей [13, 14]. Синтез аллиловых эфиров N-ацетилпроизводных указанных аминокислот был описан нами ранее [15]. При разработке процесса фосфорилирования была использована известная реакция присоединения диалкилфосфита по двойной связи непредельного соединения в присутствии пероксидов [16]. Эта реакция может быть представлена в следующем виде:

$$CH_3CO\text{-}NH\text{-}\ R\text{-}COOCH_2CH{=}CH_2 + HP(O)(OCH_3)_2 \rightarrow$$

$$\rightarrow CH_3C(O)\text{-}NH\text{-}\ R\text{-}C(O)O(CH_2)_3 - P(O)(OCH_3)_2.$$

В результате образуются 3-диметоксифосфорил-1-пропиловые эфиры N-ацетилпроизводных аминокислот с радикалом R.

В качестве исходных веществ были использованы следующие соединения: аллиловый эфир N-ацетилглицина (**I**), аллиловый эфир N-ацетил-β-аланина (**II**), аллиловый эфир N-ацетил-γ-аминомасляной кислоты (**III**), диаллиловый эфир N-ацетил-L-глутаминовой кислоты (**IV**) и диаллиловый эфир N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты (**V**). Их характеристики описаны в работе [15].

Реакцию осуществляли в запаянной ампуле в атмосфере азота при нагревании смеси аллилового эфира с избытком диметилфосфита (мольное соотношение 1:10) при температуре 135–140 °С. Для инициирования реакции присоединения использовали *трет*-бутилпероксид в количестве 5 мол.% от исходного аллилового эфира. По окончании реакции избыток диметилфосфита отгоняли в вакууме при нагревании реакционной смеси на кипящей водяной бане. Остаток растворяли в хлороформе, перемешивали при комнатной температуре с активированным углем, уголь отфильтровывали и удаляли хлороформ в вакууме при температуре бани 100 °С. Продукт реакции вакуумировали до постоянной массы. Попытки перегонки полученных соединений в вакууме с целью их очистки не привели к успеху, так как происходила их деструкция.

Синтезированные 3-диметоксифосфорил-1-пропиловые эфиры N-ацетил-производных аминокислот представляют собой вязкие жидкости желтого цвета со специфическим запахом, легко растворимые в воде, низших спиртах и хлороформе. Физико-химические показатели синтезированных 3-диметоксипропиловых эфиров N-ацетилпроизводных аминокислот приведены в таблице.

Физико-химические показатели 3-диметоксифосфорил-1-пропиловых эфиров N-ацетилпроизводных аминокислот

Physico-chemical characteristics of N-acetyl amino acids' 3-dimethoxyphosphoryl-1-propyl esters

Исходный аллиловый эфир	n_D^{20}	Брутто-формула	Элементный состав продукта								Выход,%
			вычислено, %				найдено,%				
			C	H	N	P	C	H	N	P	
I	1,4725	$C_9H_{18}NO_6P$	40,45	6,74	5,24	11,61	41,62	6,78	5,17	10,55	82,3
II	1,4730	$C_{10}H_{20}NO_6P$	42,70	7,12	4,98	11,03	42,72	8,12	4,93	10,81	80,7
III	1,4660	$C_{11}H_{22}NO_6P$	44,74	7,43	4,74	10,51	44,46	8,28	4,82	10,36	78,0
IV	1,4765	$C_{17}H_{33}NO_{11}P_2$	41,72	6,74	2,86	12,67	41,32	7,01	2,76	13,06	45,4
V	1,4796	$C_{16}H_{31}NO_{11}P_2$	40,42	6,52	2,94	13,05	39,80	6,74	2,89	13,40	72,2

На основании полученных экспериментальных результатов было установлено, что полнота конверсии аллилового эфира зависит от природы применяемой N-ацетиламинокислоты. Фосфорилирование моноаллиловых эфиров **I–III** в условиях продолжительности нагревания реакционной смеси 8–10 ч протекает с выходом целевого продукта ~ 80%. Фосфорилирование диаллиловых эфиров **IV** и **V** за указанное время достигает не выше 30%. Увеличение продолжительности нагревания до 28–30 ч привело к повышению выхода целевых продуктов. Пониженная реакционная способность при фосфорилировании аллиловых связей может быть вызвана пространственными затруднениями применяемых эфиров. Аналогичная картина наблюдается и при реакции этерификации N-ацетилпроизводных дикарбоновых аминокислот, в результате которой выход диаллиловых эфиров L-глутаминовой кислоты не превышал 60%, а L-аспарагиновой – 30%.

С нашей точки зрения, 3-диметоксифосфорил-1-пропиловые эфиры N-ацетилглицина, N-ацетил-β-аланина и N-ацетил-γ-аминомасляной кислот являются наиболее перспективными для применения вследствие технологичности процесса их производства. Все три стадии процесса протекают с достаточно высоким выходом, полученные продукты легко подвергаются очистке и стабильны при хранении. Эти вещества терапевтически активны и представляют интерес для получения на их основе нового класса лекарственных средств антигипоксического действия и препаратов для регулирования системного артериального давления.

ИК-спектры фосфорилированных аминокислот содержат интенсивные полосы поглощения в области 1738–1720 $см^{-1}$, что соответствует характеристическому поглощению сложноэфирной группы 1750–1735 $см^{-1}$. Полосы в области 1665–1642 $см^{-1}$ относятся к поглощению амидных

групп. Поглощения при 1050–995 $см^{-1}$ могут служить подтверждением присутствия в алифатическом соединении группы P–O–C, а полосы при 1190–1170 $см^{-1}$ свидетельствуют о присутствии алкилфосфита P–O–CH_3 при наличии полосы 1030 $см^{-1}$ [17].

Заключение. Разработаны препаративные методы синтеза фосфорилированных аминокислот. Осуществлена реакция фосфорилирования аллиловых эфиров N-ацетилпроизводных аминокислот путем присоединения диметилфосфита по двойной связи аллильной группы в присутствии пероксида *трет*-бутила. Синтезированы и охарактеризованы 3-диметоксифосфорил-1-пропиловые эфиры N-ацетилпроизводных глицина, β-аланина, γ-аминомасляной, L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислот.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки технологий производства фармацевтических субстанций, перспективных для расширения ассортимента лекарственных средств антигипоксического и кардиоваскулярного действия, а также корректоров патологий центральной нервной системы.

Список использованных источников

1. Пат. 3969398 США, МКИ C07F 9/38. Process for producing N-phosphonomethyl glycine / Hershmann Arnold (США); Monsanto Com. – № 465976; Заявл. 01.05.1974; Опубл. 13.07.1976.

2. Пат. 4348522 США. N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid salts with piperazine, cyclohexylamine and calcium / Schultz Robert J.(США), Starks Fred W.(США) Stark Associates, Inc. – № 06/261915; Заявл. 08.05.1981; Опубл. 07.09.1982.

3. Пат. 5491135 A США. Compositions of N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid and methods of their use as broad spectrum antivirals / Blough Herbert A. (США). U.S. Bioscience, Inc. – № 08/032234; Заявл. 17.03.1993; Опубл. 13.02.1996.

4. Синтез и фармакологическая активность 2-димето-ксифосфинилэтиловых эфиров N-ацетилированных нейроактивных аминокислот / А. А.Озеров [и др.] // Хим. фарм. журн. – 1993. – Т. 27. – № 5. – С. 39–42.

5. Петров, В. И. Новые подходы к коррекции поведенческих и мнеститических расстройств при фармакотерапии артериальной гипертензии пропранололом / В. И. Петров, М. Ю. Соломин // Южно-рос. мед. журн. – 1998. – № 2. – С. 2–5.

6. Ди-(3-диметоксифосфорил)пропиловый эфир N-ацетил-DL-аспарагиновой кислоты, обладающий ноотропной активностью: а.с. 1658619 A1 СССР, МКИ 5 C07F 9/40. Зявл. 1989; опубл. 1996.

7. Ди-(3-диэтоксифосфорил)пропиловый эфир N-ацетил-DL-глютаминовой кислоты, обладающий гипертензивной активностью: а.с. 1658618 СССР, МКИ 5 C07F 9/40. Зявл. 1988; опубл. 1996.

8. Оценка антигипоксической активности нового фосфорилированного производного нейромедиаторной аминокислоты β-аланина / Н. Е. Слюнькова [и др.] // Токсикологич. вестн. – 2003. – № 5. – С. 13–16.

9. Макарова, Л. М. Изучение нейропротекторного действия производного аспарагиновой кислоты при реперфузионных повреждениях мозга / Л. М. Макарова, В. Е. Погорелый // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2004. – Т. 67. – № 5. – С. 13–16.

10. Макарова, Л. М. Изучение противогипоксической активности глицина и его фосфорилированного производного / Л. М. Макарова, В. Е. Погорелый // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2006. – Т. 69, № 3. – С. 71–73.

11. Погорелый, В. Е. Экспериментальная оценка эффективности глицина и его фосфорилированного производного при ишемических повреждениях головного мозга / В. Е. Погорелый, Л. М. Макарова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2006. – Т. 69, № 6. – С. 24–26.

12. Михей, И. В. Синтез фосфорилированных аминокислот / И. В. Михей, В. В. Сивчик // Химические проблемы современности: тез. докл. 9-й Укр. науч. конф. молодых ученых. – Винница, 2016. – С. 51.

13. Получение и применение N-ацетил-α-аминокислот / З. И. Куваева [и др.] // Хим. фарм. журн. – 2010. – Т. 44. – № 6. – С. 22–23.

14. Производные N-ацетил аминокислот / М. М. Маркович [и др.] // Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: Сб. науч. тр. – Минск: Беларус. навука, 2013. – С. 289–295.

15. Синтез аллиловых эфиров N-ацетилпроизводных аминокислот / З. И. Куваева [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер хім.навук. – 2016. – № 1. – С. 52–56.

16. Рахимов, А. И. Синтез фосфорорганических соединений. Гомолитические реакции / А. И. Рахимов. – М., 1985. – С. 149, 163–165.

17. Беллами, А. Инфракрасные спектры сложных молекул / А. Беллами. – М., 1963. – С. 430.

References

1. Hershman A., Monsanto Company, Process for producing N-phosphonomethyl glycine, US, Pat. № 3969398 A, 1976.

2. Schultz R. J., Starks Fred W. Stark Associates, N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid salts with piperazine, cyclohexylamine and calcium, US, Pat. № 4348522, 1982.

3. Blough H. A., U.S. Bioscience, Compositions of N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid and methods of their use as broad spectrum antivirals, US, Pat. № 5491135 A, 1996.

4. Ozerov A. A., Brel' A. K., Petrov V.I., Grigor'ev I.A., Gaevaia L.M., Gunger A.A., "Synthesis and pharmacological activity of neuroactive N-acetyl amino acid 2-dimethoxyphosphinylethyl esters", Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal [Pharmaceutical Chemistry Journal], 1993, vol. 27, no. 5, pp. 39–42.

5. Petrov V. I., Solomin M. Iu., "New approaches for correction of behavioral and mnestic disorders in pharmacotherapy of arterial hypertension with propranolol", Iuzhno-Rossiiskii Meditsinskii zhurnal [Medical Journal of South Russia], 1998, no. 2, pp. 2–5.

6. Kovalev G. V., Rakhimov A. I., Petrov V. I., Ozerov A. A., Sazhin V. A., Buzinova O. P., Ianitskaia A. V., Volgogradskii politekhnicheskii institut, Volgogradskii meditsinskii institut, Di-(3-dimetoksifosforil)propilovyi efir N-atsetil-DL-asparaginovoi kisloty, obladaiushchii nootropnoi aktivnost'iu [N-acetyl-DL-aspartic acid di-(3-dimethoxyphosphoryl)propyl ester with nootropic activity], USSR, Pat. 1658619, 1996.

7. Kovalev G. V, Rakhimov A. I, Petrov V. I, Ozerov A. A, Sazhin V. A, Buzinova O. P, Novikov M. S, Grigor'ev I. A, Volgogradskii politekhnicheskii institut, Volgogradskii gosudarstvennyi meditsinskii institut, Di-(3-dietoksifosforil)propilovyi efir N-atsetil-DL-gliutaminovoi kisloty, obladaiushchii gipertenzivnoi aktivnost'iu [N-acetyl-DL-glutamic acid di-(3-diethoxyphosphoryl)propyl ester with hypertension activity], USSR, Pat. 1658618, 1996.

8. Sliun'kova N. E., Pogorelyi V. E., Makarova L. M., Sliun'kova T. E., "The evaluation of antihypoxic activity for a novel phosphorylated derivative of β-alanine, a neuromediator amino acid", Toksikologicheskii vestnik [Toxicological Bulletin], 2003, no. 5, pp.13–16.

9. Makarova L. M., Pogorelyi V. E., "A study of neuroprotective action of an aspartic acid derivative in treatment of reperfusion brain damage", Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiia [Experimental and Clynical Pharmacology], 2004, vol. 67, no. 5, pp. 13–16.

10. Makarova L. M., Pogorelyi V. E., "The study of the antihypoxic activity of glycine and its phosphorylated derivative", Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiia [Experimental and Clynical Pharmacology], 2006, vol. 69, no. 3, pp. 71–73.

11. Pogorelyi V. E., Makarova L. M., "Experimental efficiency evaluation for glycine and its phosphorilated derivative in treatment of ischemic brain damage", Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiia [Experimental and Clynical Pharmacology], 2006, vol. 69, no. 6, pp. 24–26.

12. Mikhei I. V., Sivchik V. V., "Synthesis of phosphorylated amino acids", Zb.tez 9-toï Ukraïns'koï naukovoï konferentsiï studentiv, aspirantiv i molodikh uchenikh z mizhnarodnoiu uchastiu «Khimichni problemi s'ogodennia» (29–30 bereznia 2016 roku, m. Vinnitsia) [Collection of abstracts 9-th Ukrainian conference of students and young scientists with international participation "Chemical problems of today" (29-30 March 2016, m. Vinnytsya)], Vinnytsia, UA, 2016, p. 51.

13. Kuvaeva Z. I., Lopatik D. V, Nikolaeva T. A., Knizhnikova A. N., Naidenov V. E., Markovich M. M., "Preparation and use of N-acetyl α-amino acids", Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal [Pharmaceutical Chemistry Journal], 2010, vol. 44, no. 6, pp. 22–23.

14. Markovich M. M., Nikolaeva T. A., Knizhnikova A. N., Naidenov V. E., Lopatik D. V., "N-acetyl amino acid derivatives", Khimicheskie reaktivy, reagenty i protsessy malotonnazhnoi khimii: Sbornik nauchnykh trudov [Chemical reagents and processes of small-scale chemistry. Collection of scientific papers], Belaruskaia navuka, Minsk, BY, 2013, pp. 289–295.

15. Kuvaeva Z. I., Lopatik D. V., Bondareva O. M., Markovich M. M., Mikhei I. V., "Synthesis of N-acetyl amino acids allyl esters", Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2016, no. 1, pp. 52–56.

16. Rakhimov A. I., Sintez fosfororganicheskikh soedinenii. Gomoliticheskie reaktsii [Synthesis of organophosphorus compounds. Homolytic reactions], Nauka, Moscow, RU, 1985.

17. Bellamy L. J., Infrakrasnye spektry slozhnykh molekul [The infra-red spectra of complex molecules], Translated by Akimov V. M., Pentin Iu. A., Teterin E. G., in Pentin Iu. A. (ed.), Izdatel'stvo inostrannoi literatury, Moscow, RU, 1963.

Информация об авторах

Куваева Зоя Ивановна – д-р хим. наук, зав. лаб., Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова ,13,220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: extract@ifoch.bas-net.by .

Лопатик Дина Владимировна - канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by.

Бондарева Ольга Михайловна – науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E -mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by.

Сивчик Виктория Викторовна – мл. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by.

Information about the authors

Zoja I. Kuvaeva – Dr. Sc. (Chemistry), Head of laboratory, Institute Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: extract@ifoch.bas-net.by.

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

Olga M. Bondareva – Researcher, Institute Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by.

Viktorija V. Sivchik – Junior Researcher, Institute Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by.

ISSN 1561-8331(print.)

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 573.6.086.83:57.083.3+619.636

Поступила в редакцию 29.12.2016
Received 29.12.2016

И. И. Вашкевич[1], А. А. Ястребова[1], О. С. Куприенко[1], Г. С. Корнилович[2], Л. Н. Сухенко[2], А. И. Шибеко[2], О. В. Свиридов[1]

[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов, Минск, Беларусь

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИНА Т-2 В КОРМАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Аннотация: Разработан и испытан набор реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 для определения токсина Т-2 в кормах и пищевой продукции методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа в микропланшетном формате. Установленные технико-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню развития иммуноанализа и позволяют с надлежащей точностью определять содержание токсина Т-2 в диапазоне от 30 до 1000 мкг/кг в сельскохозяйственной продукции.

Ключевые слова: микотоксины, токсин Т-2, иммуноферментный анализ

Для цитирования: Реагенты для иммуноферментного определения токсина Т-2 в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 63–71.

I. I. Vashkevich[1], A. A. Yastrebova[1], O. S. Kuprienko[1], G. S. Kornilovich[2], L. N. Sukhenko[2], A. I. Shibeko[2], O. V. Sviridov[1]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Central research laboratory of Grain Products, Minsk, Belarus

REAGENTS FOR AN ENZYME IMMUNOASSAY OF T-2 TOXIN IN FEEDS AND FOODS

Abstract: A reagent kit EIA-TOXIN T-2 for the determination of mycotoxin T-2 toxin in feeds and foods by a direct competitive enzyme immunoassay using microtitration plate has been developed and tested. The evaluated parameters of the kit and metrological characteristics of the technique of measurements correspond to the modern level of immunoassay development and provide the determination of T-2 toxin content of agricultural products in a range of 30 to 1000 μg/kg with proper accuracy and precision.

Keywords: mycotoxins, T-2 toxin, enzyme immunoassay

For citation: Vashkevich I. I., Yastrebova A. A., Kuprienko O. S., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. Reagents for an enzyme immunoassay of T-2 toxin in feeds and foods. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 63–71 (In Russian).

Введение. Токсин Т-2 представляет собой метаболит грибов *Fusarium*, конкретно *F. Sporotrichioides*, который по экспертным оценкам загрязняет не менее четверти зерновых культур, выращиваемых в мире. Это соединение является одним из самых опасных для здоровья человека и сельскохозяйственных животных микотоксином. Главным механизмом его токсического действия является ингибирование биосинтеза белка, вызывающее апоптоз, что проявляется в болезнях крови и угнетении иммунной системы [1].

Существует международная система обязательного контроля кормов и продуктов на наличие шести основных микотоксинов, в число которых входит токсин Т-2. Для проведения скрининговых исследований содержания микотоксинов в сельскохозяйственной продукции используются наборы реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА). Разработка таких наборов и их системное применение в контрольных лабораториях дают очевидный социальный эффект, который состоит в обеспечении качества и безопасности кормов и продовольствия, а значит, в защите

жизни и здоровья человека и животных, охране окружающей среды. Экономическая эффективность разработки современных реагентов для выполнения ИФА заключается в финансовой выгоде последующих мероприятий по существенному снижению потерь и вреда вследствие контаминации продуктов и кормов микотоксинами. В число таких мероприятий входят предотвращение микотоксикозов у животных путем неприменения или обезвреживания кормов, в которых ИФА-наборами будет выявлено высокое содержание микотоксинов, в частности токсина Т-2. Для нашей страны важной экономической составляющей создания и широкого применения ИФА-наборов на микотоксины является импортозамещение. Все эти факторы стали обоснованием задания Государственной программы «Импортозамещающие биотехнологии» на 2013–2015 годы по разработке отечественных наборов реагентов для иммуноферментного определения микотоксинов в кормах для животных, пищевой продукции и продовольственном сырье. В предыдущих публикациях изложены результаты выполнения этого задания, относящиеся к наборам реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН [2] и ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН [3]. В данной работе описаны разработка и свойства набора ИФА-ТОКСИН Т-2.

Материалы и методы. Чистый токсин Т-2, имеющий статус стандарта, поступил от фирмы «Romer Labs» (Австрия), детергенты и бактериостатики приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Разборные микропланшеты из полистирола, состоящие из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), куплены у «Greiner bio-one» (Германия). Очищенная пероксидаза из корней хрена (ПХ) получена от фирмы «ДИА-М» (РФ). Реагенты для реакции пероксидазного окисления – растворы хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и субстрата (H_2O_2), а также стоп-реагент (раствор H_2SO_4) поступили от УП «Хозрасчетного опытного производства ИБОХ НАН Беларуси». Измельченные образцы различных кормов, в которых содержание токсина Т-2 установлено с помощью набора реагентов RIDASCREEN® FAST T-2 TOXIN (Германия) и референсный материал предоставлены ГУ «ЦНИЛхлебопродукт» (Беларусь).

В экспериментах применяли воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм·см, очищенную в модульной установке Water Pro Plus («Labconco», США). Для детекции колориметрического сигнала в ИФА использовали прибор АИФ М/340 («Витязь», Беларусь). Масс-спектры получали с использованием масс-селективного детектора Agilent 6120 в комплекте с жидкостным хроматографом Agilent 1200 (США). Спектры MALDI-TOF снимали в масс-спектрометре Microflex LRF («Bruker», Германия).

N-гидроксисукцинимидный эфир гемисукцината Т-2 токсина синтезировали следующим образом: 5 мг (10,8 мкмоль) Т-2 токсина растворяли в 0,2 мл сухого пиридина; добавляли 105 мг (1050 мкмоль) ангидрида янтарной кислоты и 1,3 мг (10,3 мкмоль) 4-диметиламинопиридина; перемешивали реакционную смесь в течение 3 ч при температуре плюс +50 ºС. Пиридин упаривали, остаток растворяли в хлороформе, экстрагировали водой 4 раза, водную фазу отбрасывали. К раствору в хлороформе добавляли безводный Na_2SO_4, затем растворитель упаривали. Об образовании гемисукцината Т-2 токсина судили по результатам ВЭЖХ-МС. Масс-спектр (ESI): *m/z* 589 $[M+Na]^+$. $C_{28}H_{38}O_{12}$. Вычислено 566. Полученный гемисукцинат Т-2 токсина растворяли в 0,2 мл диметилформамида, содержащего 1,5 мг (13 мкмоль) N-гидроксисукцинимида и 2,0 мкл (13 мкмоль) диизопропилкарбодиимида. Перемешивали в течение 2 ч при охлаждении до (+4–10) ºС, выпавший осадок мочевины отделяли после центрифугирования, растворитель упаривали. Образовавшийся остаток представлял собой N-гидроксисукцинимидный эфир гемисукцината Т-2 токсина.

Для синтеза ферментного конъюгата к раствору 3,7 мг ПХ в 0,5 мл 0,1 М $NaHCO_3$ (pH 8,3) добавляли раствор 2,8 мг (4,3 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира гемисукцината Т-2 токсина в 0,1 мл диметилформамида. Инкубировали в течение 18 ч при комнатной температуре со встряхиванием. Очистку проводили методом гель-фильтрации на колонке с Superose 12 (30×1 см), уравновешенной 0,15 М NaCl и хранили при – 18 ºС в 50 %-ном глицерине.

Иммуноген получали следующим образом. К раствору 10 мг бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0,5 мл 0,1 М $NaHCO_3$ (pH 8,3) добавляли раствор 4,2 мг (6,4 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира гемисукцината Т-2 токсина в 0,1 мл диметилформамида. Проводили инкубацию и очистку, как в случае конъюгата с ПХ. Иммуноген лиофилизовали и хранили при –18 ºС.

Получение антисыворотки проводили по следующей схеме. Перед каждой иммунизацией готовили эмульсию конъюгата БСА с гемисукцинатом Т-2 токсина и полного адъюванта Фрейнда. Для иммунизации одного кролика использовали 0,45 мг иммуногена. Для получения стабильной эмульсии смесь 0,5 мл раствора антигена и 0,5 мл адъюванта многократно набирали в шприц и с силой выпускали через тонкую иглу. Свежеприготовленную эмульсию в количестве 1 мл вводили подкожно и внутрикожно в 15–20 точек спины и шеи каждому кролику. Интервалы между первыми инъекциями составляли 2 недели, а затем проводили иммунизацию 0,25 мг иммуногена один раз в 20–21 день. Со второго цикла, осуществляли периодический отбор проб крови из ушной вены животных. Иммунизацию продолжали в течение 6 мес.

Полученные образцы сыворотки тестировали на наличие связывающей способности в отношении токсина Т-2. Конечный титр поликлональных антител (ПАт) определяли как рабочее разведение антисыворотки в тест-системе, включающей покрытую антикроличьими антителами твердую фазу, при связывании ферментного конъюгата в разведении 1 : 10 000 в отсутствие немеченого токсина Т-2, соответствующего колориметрическому сигналу ПХ около 2,0 оптических единиц.

Микропланшетный иммуносорбент получали биоспецифической иммобилизацией ПАт к токсину Т-2 (в титре 1 : 10 000) через пассивно адсорбированные на внутренней поверхности лунок очищенные ПАт овцы к иммуноглобулинам класса G кролика из раствора объема 0,1 мл с концентрацией 5 мг/л. Для стабилизации иммобилизованных ПАт применяли специальные растворы, содержащие инертные для анализа белки, неорганические соли, сахара и антибактериальные добавки.

Градуировочные растворы Т-2 токсина приготавливали объемно-весовым методом, используя водно-метанольный раствор.

В состав готового набора ИФА-ТОКСИН Т-2 входят следующие компоненты: иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок с биоспецифически иммобилизованными ПАт, готовый к использованию, 1 планшет; планшет для смешивания, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, 1 планшет; градуировочные растворы, жидкие препараты с условной (с учетом фактора разведения при пробоподготовке) величиной концентрации токсина Т-2: C_0 – 0 мкг/л; C_1 – 30 мкг/л; C_2 – 100 мкг/л; C_3 – 300 мкг/л; C_4 – 1000 мкг/л; 5 флаконов, (0,7±0,02) мл; конъюгат, 11-кратный концентрат, жидкий препарат, 1 флакон, (1,2±0,02) мл; раствор для разведения конъюгата, жидкий препарат, 1 флакон, (12,0±0,5) мл; промывочный раствор, 10-кратный концентрат, жидкий препарат, 1 флакон (30,0±0,5) мл; раствор хромогена, жидкий препарат, 1 флакон (0,7±0,02) мл; субстратный буферный раствор, жидкий препарат, 1 флакон (14,0±0,5) мл; стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон (14,0±0,5) мл.

Методика применения набора ИФА-ТОКСИН Т-2 состоит в следующем. Образец корма или пищевого продукта размалывали на мельнице типа «Циклон» и просеивали через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм. Точную навеску (5,0 г) размолотого образца экстрагировали 25 мл смеси метанол–вода в объемном соотношении 70:30, фильтровали, доводили pH до значения 6–8. В пробирку отбирали дозатором 0,5 мл фильтрата и добавляли 0,5 мл дистиллированной воды. Раствор перемешивали и добавляли 3 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол–вода 35:65. Закрывали пробирку пробкой, раствор перемешивали и использовали для проведения ИФА в течение 2 ч. При анализе каждой пробы выполняли два параллельных определения одного образца.

Приготовление рабочих растворов некоторых компонентов набора. Раствор конъюгата получали непосредственно перед использованием путем смешивания одной части концентрата и 10 частей раствора для разведения. Концентрат промывочного раствора разбавляли водой в 10 раз. Для приготовления хромоген-субстратной смеси раствор хромогена разводили субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1:20).

В ходе анализа в лунки планшета для смешивания вносили по 100 мкл конъюгата, а затем добавляли в дубликатах по 50 мкл каждого градуировочного раствора и растворов проб каждого исследуемого образца. Немедленно после перемешивания отбирали восьмиканальным дозатором и вносили в лунки микропланшетного иммуносорбента по 100 мкл градуировочных растворов или растворов исследуемых проб вместе с коньюгатом. Закрытый иммуносорбент инкуби-

ровали в течение 30 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от +20 до +25 ºС. По окончании времени инкубации удаляли растворы из всех лунок и с применением восьмиканального дозатора проводили 4-кратное промывание планшета промывочным раствором порциями по 200 мкл на одно промывание каждой лунки, выдерживая заполненные лунки не менее 10 с. Далее в каждую лунку промытого планшета-иммуносорбента восьмиканальным дозатором вносили 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Закрытый планшет инкубировали в течение 10 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от +20 до +25 ºС. По истечении времени инкубации в каждую лунку планшета восьмиканальным дозатором вносили 100 мкл стоп-реагента, растворы в лунках перемешивали круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола. В течение не более 15 мин после добавления стоп-реагента измеряли оптическую плотность в каждой лунке на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм.

Обработку результатов измерений проводили с применением прилагаемого к набору шаблона в формате Microsoft Excel. В соответствующие графы шаблона вносили полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов C_0–C_4 и растворов исследуемых проб. Шаблон автоматически рассчитывает параметры связывания ферментного конъюгата токсина Т-2 с иммобилизованными ПАт для градуировочных растворов C_1–C_4 и для раствора неизвестной пробы относительно градуировочного раствора C_0, строит градуировочную зависимость и рассчитывает массовую долю токсина Т-2 в исследуемой пробе, *C*, мкг/кг (ppb).

При разработке набора ИФА-ТОКСИН Т-2 его технико-аналитические характеристики и диапазон измерений подбирались экспериментально с учетом установленных в Беларуси предельно допустимых уровней содержания токсина Т-2 кормах, кормовых добавках и сырье для производства комбикормов (не выше 100 мкг/кг) [4]. Метрологические характеристики методики выполнения измерений массовой доли токсина Т-2 набором реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 получены на основании экспериментальных данных в ходе внутрилабораторных испытаний с использованием образцов зерна злаковых и зернобобовых (пшеница, кукуруза, соя), продуктов их переработки (отруби ржаные, гречневая крупа), соевого шрота и комбикормов. При этом концентрации микотоксина находились на начальном (72 мкг/кг), среднем (170–375 мкг/кг) и конечном (550–800 мкг/кг) отрезках градуировочной кривой. Подготовленные образцы анализировали в условиях повторяемости в лаборатории с изменяющимся фактором: «время + оператор». Показатели прецизионности и правильности определяли соответственно по СТБ ИСО 5725-3 и СТБ ИСО 5725-4, а оценки неопределенности делали, как описано в руководствах [5, 6].

Результаты и их обсуждение. Токсин Т-2 имеет молекулярную массу 466,5 г/моль и представляет собой 3-гидрокси-4,15-диацетокси-8-изобутирилокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен или (по-другому) 12,13-эпокситрихотец-9-ен-3a,4b,8a,15-тетрол-4,15-диацетат-8-изовалериат. Как следует из химического строения, показанного на рис. 1, данный микотоксин относится к трихотеценам, химическим соединениям, также получившим название сесквитерпеноидов. Характерная особенность этого семейства, которое включает почти треть всех известных микотоксинов, состоит в том, что они имеют тетрациклическое трихотеценовое ядро, содержащее двойную связь у С9 и эпоксидную группу при С12, С13. Особенностью трихотеценов А, к которым относятся токсин Т-2 и его аналог НТ-2 (неацетилированная ОН-группа у С4), является присутствие у С8 функциональной группы, отличной от карбонильной, которая характерна для трихотеценов В. В литературе описаны несколько способов синтеза белковых конъюгатов токсинов Т-2 и НТ-2, пригодных для получения поли- [7–10] или моноклональных (МАт) [11, 12] антител к этому гаптену, а также для использования в непрямом [10, 11] или прямом [8, 9, 12] ИФА. Так, для получения иммуногенного конъюгата с бычьим сывороточным альбумином описан синтез гемиглутарата Т-2 токсина [8]. В работе [10] синтезированный данным способом конъюгат использован для получения поликлональных антител, которые в комбинации с твердофазным антигеном на основе альбумина кролика или желатина, ацилированных N-гидроксисукцинимидным эфиром гемиглутарата токсина Т-2, применялись при конструировании тест-системы непрямого конкурентного ИФА. В одной из ранних работ [8] описана система прямого конкурентного ИФА, для которой имму-

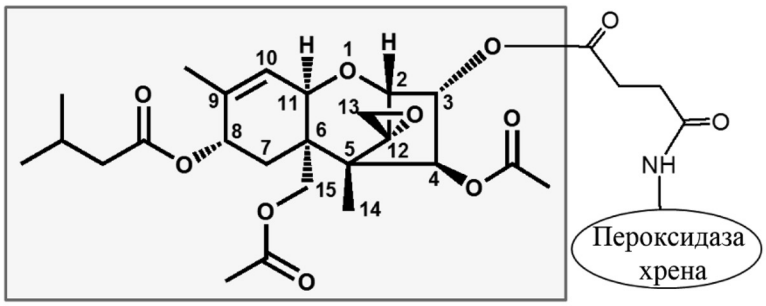


Рис. 1. Схема строения конъюгата токсина Т-2 и пероксидазы хрена (структурная формула токсина Т-2 выделена)

Fig. 1. The scheme of the structure of the conjugate toxin T-2 and horseradish peroxidase (the structural formula of toxin T-2 is delineated)

нореагенты были получены на основе токсина Т-2, ацилированного янтарным ангидридом, а затем присоединенного через водорастворимый карбодиимид к альбумину или ПХ. Сукцинильное производное токсина НТ-2, конъюгированное с ПХ, оказалось полезным в системе высокочувствительного прямого ИФА токсина Т-2, включавшей МАт, которое было получено иммунизацией мышей гомологичным конъюгатом токсина НТ-2 с альбумином [12]. В этой же лаборатории разработана система гетерологичного прямого ИФА для токсина Т-2 в молоке, для которой поликлональные антитела вырабатывались у животных, иммунизированных конъюгатом альбумина человека с гемисукцинатом токсина Т-2, а меченым антигеном служил гемисукцинат токсина НТ-2, конъюгированный с ПХ [9]. Сообщалось также о модификации ОН-группы у атома С3 токсина Т-2 йодуксусной кислотой и (или) 1,1'-карбонилдиимидазолом для последующего присоединения к белку с образованием устойчивой связи [13]. В диссертационной работе [14] рассмотрены многие методические вопросы получения иммунореагентов, конструирования гомологичных и гетерологичных (в отношении иммуногена и меченого антигена на основе токсинов Т-2 и НТ-2) систем ИФА, а также метрологической валидации и практического применения этих систем.

Проанализировав большой литературный материал, мы выбрали для создания иммуноферментного набора реагентов конструкцию прямого конкурентного ИФА. Меченный ферментом токсин Т-2 синтезирован путем ацилирования ОН-группы у С3 микотоксина янтарным ангидридом с последующим получением N-гидроксисукцинимидного эфира и взаимодействием этого эфира с ε-NH_2-группами остатков лизина ПХ. Химическое строение конъюгата схематично показано на рис. 1. Иммуноген на основе БСА получали по аналогичной схеме. Содержание остатков токсина Т-2 в конъюгатах с ПХ и БСА, определенное масс-спектрометрией MALDI-TOF, составило соответственно 1,8 и 7,5 молекул Т-2 в одной молекуле белка.

Иммунизацию проводили в группе из трех кроликов. У кролика №3 наблюдался наибольший титр антисыворотки (порядка 1:10 000). Пик выработки ПАт пришелся на пятый забор крови, что отражено на рис. 2. Количественная оценка ингибиторной активности микотоксинов в отношении связывания ферментного конъюгата токсина Т-2

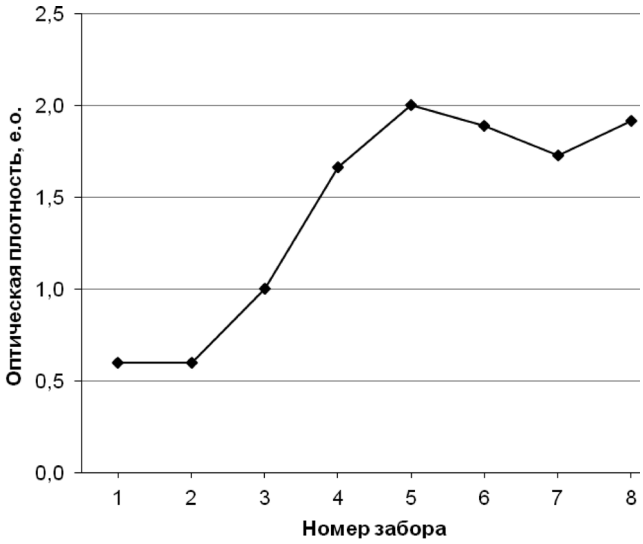


Рис. 2. Результат тестирования серии антисывороток кролика № 3 в разведении 1 : 10 000 от первого до восьмого забора крови

Fig. 2. The result of testing a series of rabbit antiserum № 3 at a 1: 10.000 dilution from the first to the eighth blood sampling

с выбранным ПАт показала, что концентрации токсинов Т-2 и НТ-2, вызывающие уменьшение связывания на 50 % (кросс-реактивности), соотносятся как 100 и 10. Микотоксины других классов не обладали способностью конкурентно ингибировать комплексообразование данного конъюгата и ПАт (перекрестные реакции < 0,1 %) и, следовательно, их присутствие в анализируемом образце не может влиять на результаты количественного определения токсина Т-2.

Набор реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 основан на принципе прямого конкурентного ИФА. Микотоксины экстрагировали из размолотого образца раствором метанол–вода 70:30. В лунки планшета для предварительного смешивания вносили конъюгат токсина Т-2 с ПХ и добавляли градуировочные растворы с известной концентрацией токсина Т-2 и подготовленные к анализу растворы проб, перемешивали и переносили смесь в лунки планшетного иммуносорбента. Во время последующей инкубации токсин Т-2 в составе градуировочного раствора или исследуемой пробы конкурирует с конъюгатом токсина Т-2 и ПХ за связывание с ПАт, биоспецифически иммобилизованными через антивидовые антитела на внутренней поверхности лунок иммуносорбента. После промывки, в ходе которой из лунок удаляли не прореагировавшие с антителами компоненты, к системе добавляли приготовленный хромоген-субстратный раствор, который позволяет визуализировать реакции антиген–антитело. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации токсина Т-2 в анализируемом образце или градуировочном растворе. Затем добавляли стоп-реагент, останавливающий цветную реакцию и одновременно изменяющий окраску раствора. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряли на микропланшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. По результатам измерений оптической плотности градуировочных растворов с известным содержанием токсина Т-2 строили градуировочную зависимость, с помощью которой определяли массовую долю токсина Т-2 в анализируемых образцах.

Базовым компонентом набора ИФА-ТОКСИН Т-2 является разборный пластмассовый микропланшет (иммуносорбент), лунки которого покрыты ПАт к токсину Т-2. Биоспецифическая иммобилизация ПАт существенно снижала расход данного иммунореагента при получении иммуносорбента с заданными аналитическими характеристиками и увеличивала устойчивость антител к метанолу в ИФА-системе. Градуировочные пробы как компоненты разработанного набора – это растворы на основе стабилизированных водно-органических сред с подобранными точными концентрациями токсина Т-2, проверенными по международным стандартам и независимыми физико-химическими методами. Конъюгат антигена с ферментом представляет собой бифункциональное химическое соединение на основе токсина Т-2 и ПХ, имеющее высокие и стабильные показатели энзиматической активности и сродства к иммобилизованным ПАт. Главные компоненты раствора хромогена (ТМБ) и субстратный раствор (H_2O_2) после смешивания взаимодействуют в ходе ферментативной реакции на заключительной стадии анализа и дают окрашенные продукты. Стоп-реагент (разбавленная H_2SO_4) останавливает ферментативный процесс с изменением окраски продуктов реакции и фиксацией ее на уровне и во времени, которые оптимальны для надежного определения путем регистрации колориметрического сигнала в видимой области спектра многоканальным планшетным спектрофотометром. В результате строили типичный калибровочный график в полулогарифмических координатах, представленный на рис. 3.

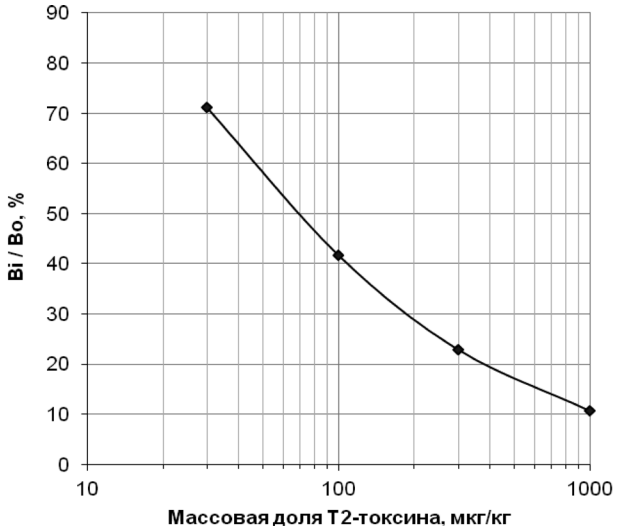


Рис. 3. Типичный градуировочный график набора реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2

Fig. 3. Typical calibration curve of EIA-TOXIN T-2 reagent kit

В табл. 1 приведены значения технико-аналитических параметров набора реагентов

ИФА-ТОКСИН Т-2 по результатам независимых ИФА, которые были выполнены в ходе внутрилабораторных испытаний опытной партии набора. Установленные в результате испытаний технико-аналитические показатели набора ИФА-ТОКСИН Т-2 соответствуют ТУ BY 100185129.151-2015 и общим требованиям качества иммуноанализа, что обеспечивает количественное определение токсина Т-2 в сельскохозяйственной продукции.

Таблица 1. **Технико-аналитические параметры набора ИФА-ТОКСИН Т-2**

Table 1. **Technical and analytical parameters of EIA-TOXIN T-2 reagent kit**

Наименование показателя	Предписанное значение	Полученные значения[5]
Соотношение B_0, B_1, B_2, B_3, B_4 [1], о.е.	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4$	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4$
B_0, о. е.	1,4–2,7	1,6–2,2
B_4, о.е., не более	0,6	0,4-0,6
B_1/B_0, %, не более	95	73-87
B_4/B_0, %, не более	35	22–30
Чувствительность[2], мкг/кг, не более	30	< 30
IC_{50} [3], мкг/кг, в пределах	50–200	106-190
Коэффициент вариации[4],%, не более	15	8–13

Примечания: [1] B_0–B_4 – средние значения оптической плотности растворов в лунках, содержащих градуировочные растворы с увеличивающейся концентрацией токсина Т-2 (C_0–C_4) соответственно, измеряемые в оптических единицах (о. е.); [2] минимальная массовая концентрация токсина Т-2, определяемая набором, которая получена в результате измерения градуировочных растворов и рассчитана на основании удвоенного значения среднего квадратичного отклонения от среднего арифметического значения B_0; [3] массовая концентрация токсина Т-2 при 50 %-ном связывании от B_0, полученная в результате измерения градуировочных растворов; [4] для результатов определения массовой концентрации токсина Т-2 в лунках, содержащих градуировочный раствор C_3; [5] диапазон значений, полученных в ходе внутрилабораторных испытаний.

Определение метрологических характеристик методики выполнения измерений содержания токсина Т-2 в зерновых и зернобобовых культурах и продуктах их переработки, кормах и комбикормах набором реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 проводили в соответствии с существующими требованиями и действующими правилами. В табл. 2 приведены полученные относительные значения показателя повторяемости σ_r, показателя промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$ с изменяющимся фактором «время+оператор», предела повторяемости r, предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(TO)}$ и относительной расширенной неопределенности U измерений массовой доли токсина Т-2 в указанной продукции растительного происхождения при доверительной вероятности $P = 0{,}95$.

Из данных табл. 2 следует, что разработанная методика обеспечивает получение результатов измерений массовой доли токсина Т-2 с надлежащими параметрами точности.

Таблица 2. **Метрологические характеристики методики выполнения измерений с использованием набора реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2**

Table 2. **Metrological characteristics of the measurement procedure using EIA-TOXIN T-2 reagent kit**

Диапазон измерений, мкг/кг	σ_r, %	$\sigma_{I(TO)}$, %	r, %	$r_{I(TO)}$, %	U, %
30,0–1000,0	8,2	9,6	23	27	20

Примечание. Предел измерений определяется значением величины нижней границы диапазона измерений.

Заключение. Разработанный набор реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 имеет современную конструкцию, основан на принципе конкурентного связывания определяемого и меченного ферментом токсина Т-2 с ПАт, биоспецифически иммобилизованными в 96 лунках разборного микропланшета, содержит эффективные вспомогательные реагенты и дает возможность одновременно исследовать 43 образца на содержание токсина Т-2. Технико-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню ИФА и требованиям контроля безопасности пищевых продуктов питания и кормов. Изделие устойчиво при хранении и применении в обычных лабораторных условиях.

Список использованных источников

1. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems / Task Force Report. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, USA. – 2003. – N. 139. – 199 p.

2. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения афлатоксина B_1 в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2016. – № 2.– С. 69–75.

3. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения зеараленона в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2016. – № 4. – С. 72–79.

4. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов: утв. постановлением Мин-ва сельск. хоз-ва и продовол. Респ. Беларусь 10.09.2014. – № 48.

5. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: под общ. ред. Л. А. Конопелько. – СПб.: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева. – 2002. – 149 с.

6. VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data. LGC (Teddington) Ltd. – 2000. – 87 p.

7. Production of antibody against T-2 toxin / F.S. Chu [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – Vol. 37. – P. 104–108.

8. Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin / J. J. Pestka [et al.] // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1981. – Vol. 58. – P. 940A–944A.

9. Esgin, S. Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin in milk / S. Esgin, E. Märtlbauer, G. Terplan // Arch. Lebensmittelhyg. – 1989. – Vol. 40. – P. 109–112.

10. Иммуноферментный метод определения токсина Т-2 в контаминированном зерне / Г. П. Кононенко [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – С. 457–462.

11. Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites / E. H. Gendloff [et al.] // Phytopathology. – 1987. – Vol. 77. – P. 57–59.

12. Hack, R. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin at pictogram level / R. Hack, E. Märtlbauer, G. Terplan // Lett. Appl. Microbiol. – 1989. – Vol. 9. – P. 133–135.

13. Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays / H. Xiao [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1995. – Vol. 43. – P. 2092–2097.

14. Hocke, K.B. Entwicklung und validierung von enzymimmuntests zum nachweis von T-2 toxin und HT-2 toxin sowie vorkommen dieser mykotoxine in lebensmitteln des deutschen markets : Inaugaural-dissertation zur erlangung der tiermedizinischen doktorwürde / K.B. Hocke. – München, 2008. – 112 p.

References

1. Niyo K. (ed.), CAST 2003, Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems, *Council for Agricultural Science and Technology, Task Force Report 139*, Ames, Iowa, USA, pp. 1–199.

2. Vashkevich I. I., Terent'eva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V., "New reagent kit for enzyme immunoassay of aflatoxin B_1 in feeds and foods", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2016, no. 2, pp. 69–75.

3. Vashkevich I. I., Terent'eva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V., "A new kit of reagents for the ELISA determination of zearalenone in feeds and foods", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2016, no. 4, pp. 72–79.

4. Veterinarno-sanitarnye pravila obespecheniia bezopasnosti kormov, kormovykh dobavok i syr'ia dlia proizvodstva kombikormov, utverzhdennye postanovleniem Ministerstva sel'skogo khoziaistva i prodovol'stviia Respubliki Belarus' ot 10.09.2014, №48 [Veterinary and sanitary rules to ensure safety of feed, feed additives and raw materials for feed production, approved by the Decree of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus from 10.09.2014, no. 48], 2011.

5. Rukovodstvo EVRAKhIM / SITAK, *Kolichestvennoe opisanie neopredelennosti v analiticheskikh izmereniiakh* [Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement], Translated by Konopel'ko, L. A., VNIIM im. D.I. Mendeleeva, St. Petersburg, RU, 2002.

6. Barwick V. J., Ellison S., *VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data*, LGC (Teddington) Ltd, Teddington, UK, 2000.

7. Chu F. S., Grossman S., Wei R. D., Mirocha C. J., "Production of antibody against T-2 toxin", *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, vol. 73, no. 1, pp. 104–108.

8. Pestka J. J., Lee S. C., Lau H. P., Chu F. S., "Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1981, vol. 58, pp. 940A–944A.

9. Esgin S., Martlbauer E., Terplan G., "Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin in milk", *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 1989, vol. 40, pp. 109–112.

10. Kononenko G. P., Burkin A. A., Soboleva N. A., Zotova E. V., "Enzyme-linked immunosorbent assay for toxin T-2 determination in contaminated grain", *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* [Applied biochemistry and microbiology], 1999, vol. 35, no. 4, pp. 457–462.

11. Gendloff E. H., Pestka J. J., Dixon D. E., Hart L. P., "Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites", *Phytopathology*, 1987, vol. 77, pp. 57–59.

12. Hack R., Märtlbauer E., Terplan G., "A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin at pictogram level", *Letters in Applied Microbiology*, 1989, vol. 9, pp. 133–135.

13. Xiao H., Clarke J. R., Marquardt R. R., Frohlich A. A., "Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, vol. 43, no. 8, pp. 2092–2097.

14. Hocke K. B., *Entwicklung und validierung von enzymimmuntests zum nachweis von T-2 toxin und HT-2 toxin sowie vorkommen dieser mykotoxine in lebensmitteln des deutschen markets: Inaugaural-dissertation zur erlangung der tiermedizinischen doktorwürde*, München, DE, 2008.

Информация об авторах

Вашкевич Ирина Игнатьевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.bas-net.by.

Ястребова Анна Андреевна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aliraflame@yandex.ru.

Куприенко Ольга Сергеевна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga_garbuz@iboch.bas-net.by.

Корнилович Галина Сергеевна – зам. директора по науке, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (пос. Октябрьский, 222220, Минская обл., Смолевичский р-н). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Суханко Лилия Николаевна – нач. отдела, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (пос. Октябрьский, 222220, Минская обл., Смолевичский р-н). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Шибеко Анна Ивановна – вед. инженер-химик, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (пос. Октябрьский, 222220, Минская обл., Смолевичский р-н). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Свиридов Олег Васильевич – д-р хим. наук, ст. науч. сотрудник, зав. лаб., Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.bas-net.by.

Information about the authors

Irina I. Vashkevich – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: vashkevich@iboch.bas-net.by.

Anna A. Yastrebova – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aliraflame@yandex.ru.

Olga S. Kuprienko – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga_garbuz@iboch.bas-net.by.

Galina S. Kornilovich – Principal Director of Scientific Research, Central Research Laboratory of Grain Products (Oktyabrsky vil., 222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Liliya N. Sukhenko – Head of Department, Central Research Laboratory of Grain Products (Oktyabrsky vil., 222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Anna I. Shibeko – Leading Chemical Engineer, Central Research Laboratory of Grain Products (Oktyabrrsky vil., 222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Oleg V. Sviridov – D. Sc. (Chemistry), Senior Researcher, Head of Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.bas-net.by.

ISSN 1561-8331(print.)
УДК 547.915.5:542.06

Поступила 20.02.2017
Received 20.02.2017

Ю. В. Мартыненко-Макаев[1], В. А. Брылёв[2], В. В. Удодова[1]

[1]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

ДУБЛЕР-КРАСИТЕЛИ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДНК-ЗОНДОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Аннотация: Современная молекулярная диагностика, основным методом которой является полимеразная цепная реакция (ПЦР), широко используется для выявления различных заболеваний и контроля за их протеканием. Наибольшую популярность в наше время получили флуоресцентно-меченные ДНК-зонды, обладающие высокой чувствительностью и простотой использования. Наиболее важной характеристикой флуоресцентно-меченных ДНК-зондов является интенсивность флуоресценции. Увеличение интенсивности флуоресценции позволяет повысить чувствительность проводимых исследований. Увеличение интенсивности флуоресценции возможно путем множественного введения флуорофоров на специальных жесткокаркасных линкерах. В данной работе в качестве жесткокаркасного линкера были использованы производные 3,5-диаминобензойной кислоты. Таким образом, в работе описан синтез реагентов-разветвителей на основе 3,5-диаминобензойной кислоты, а также получение их производных, несущих по две молекулы карбоксифлуоресцеина, а также фосфорамидитную либо азидную функцию для введения метки в олигонуклеотиды при помощи автоматического твердофазного синтеза или [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения. Показано, что полученные при помощи реагентов ДНК-зонды обладают практически двухкратным увеличением интенсивности флуоресценции и улучшенными фотофизическими характеристиками.

Ключевые слова: реагенты-разветвители, флуоресценция, дублер, 3,5-диаминобензойная кислота, флуоресцеин, ПЦР, ПЦР-РВ, усиление флуоресценции

Для цитирования: Мартыненко-Макаев, Ю. В. Дублер-красители для усиления флуоресценции ДНК-зондов в молекулярной диагностике / Ю. В. Мартыненко-Макаев, В. А. Брылев, В. В. Удодова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 72–78.

Y. V. Martynenko-Makaev[1], V. A. Brylev[2], V. V. Udodava[1]

[1]Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

ENHANCING THE FLUORESCENCE OF DNA-PROBES FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS

Abstract: Modern molecular diagnostics with polymerase chain reaction (PCR) is widely used as a basic tool for detection of various diseases and control of their course. Today the fluorescently labeled DNA-probes have the greatest popularity due to their high sensitivity and ease of use. Fluorescence intensity is the most important characteristic of fluorescently labeled DNA-probes. Increase of fluorescence intensity will enhance the sensitivity of analysis. Fluorescence intensity can be increased by multiple introduction of fluorophores based on special rigid linkers. Therefore the derivatives of 3,5-diaminobenzoic acid were used. In this paper we report on the synthesis of linkers based on 3,5-diaminobenzoic acid and their application in synthesis of the reagents with two fluorescein fluorophores and phosphoramidite or azide function for introduction of label into oligonucleotides. It is shown that obtained DNA-probes have almost twofold increase of fluorescence intensity and improved photophysical characteristics.

Keywords: branching reagents, fluorescence, doubler, 3,5-diaminobenzoic acid, fluorescein, PCR, PCR-RT, fluorescence enhancement

For citation: Martynenko-Makaev Y. V., Brylev V. A., Udodava V. V. Enhancing the fluorescence of DNA-probes for molecular diagnostics. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 72–78 (In Russian).

Введение. Современная молекулярная диагностика, основным методом которой является полимеразная цепная реакция, широко используется для выявления различных заболеваний и контроля за их протеканием. Применение ДНК-диагностики стало возможным с появлением специальных молекул – зондов. Так, неотъемлемыми частями любого ДНК-зонда являются: фрагмент ДНК, комплементарный исследуемой молекуле нуклеиновой кислоты в каком-либо организме; метка, представляющая собой радиоактивную частицу, флуоресцентный или аффинный фрагмент.

© Мартыненко-Макаев Ю. В., Брылёв В. А., Удодова В. В., 2017

Наибольшую популярность в наше время получили флуоресцентно-меченные ДНК-зонды, обладающие высокой чувствительностью и простотой использования. Однако до сих пор ведутся исследования и разработки по улучшению, как правило, фотофизических свойств. Так, многими исследователями были предприняты попытки снизить фоновую флуоресценцию для полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени [1]. Данное исследование проводилось с целью повышения интенсивности флуоресценции ДНК-зондов за счет введения нескольких молекул флуоресцентных красителей в молекулу зонда.

Известно, что при наличии в одном зонде нескольких флуорофоров может происходить неблагоприятное «самотушение», т. е. значительное ослабление флуоресценции [2]. Однако данное явление наблюдается при условии, что флуорофоры находятся на гибких линкерах, обеспечивающих невыгодную ориентацию красителей. Процесс «самотушения» можно минимизировать или полностью исключить с помощью жестких линкеров, обеспечивающих определенное пространственное расположение нескольких красителей в одном зонде [3–5]. Поэтому для создания ДНК-зонда с улучшенными фотофизическими характеристиками было решено синтезировать жесткокаркасные реагенты-разветвители (дублеры) на основе 3,5-диаминобензойной кислоты, содержащие в качестве флуоресцентных красителей 5-карбоскифлуоресцеин и 6-карбоксифлуоресцеин (рис. 1) и несущие фосфорамидитную либо азидную функцию для введения метки в олигонуклеотиды при помощи автоматического твердофазного синтеза или [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения соответственно.

Так, из динитробензойной кислоты в семь стадий был получен реагент **10** (рис. 2) для введения модификаций в олигонуклеотиды, который был испытан в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза [6] (рис. 3). Также из 3,5-диаминобензойной кислоты в две стадии был получен реагент **15** (рис. 4), содержащий азидную функцию, для введения модификации посредством [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения.

Последующий анализ фотофизических характеристик модифицированных олигонуклеотидов продемонстрировал эффективность использования жесткокаркасного дублера на основе 3,5-диаминобензойной кислоты. Интенсивность флуоресценции олигонуклеотида **11**, модифицированного дублером **10**, в 1,7 раза превысила интенсивность флуоресценции олигонуклеотида, модифицированного одной молекулой флуоресцеина [6].

Экспериментальная часть. Реагент **10**, содержащий амидофосфитную функцию, получали из 3,5-динитробензойной кислоты **3** в семь стадий (рис. 2). Сперва из кислоты **3** по описанной методике [7] получали хлорангидрид **4**, который затем конденсировали с 4-транс-аминоциклогексанолом. После защиты гидроксильной группы в соединение **6** вводили две молекулы 5-карбоксифлуоресцеина **1**, используя его пивалатзащищенный пентафторфениловый эфир. После снятия ТГП-защиты получали амидофосфит **10**, который испытывали в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза (рис. 3). Структура полученного соединения подтверждалась методом ЯМР-спектрометрии.

В качестве исходного соединения для синтеза дублера **15** использовали 3,5-диаминобензойную кислоту **12**, которую ацилировали активированным пентафторфениловым эфиром пивалатзащищенного 6-карбоксифлуоресцеина **2** (рис. 4). Далее в полученный реагент **13** вводили азидную группу путем конденсирования с 3-азидопропил-1-амином. В качестве конденсирующего

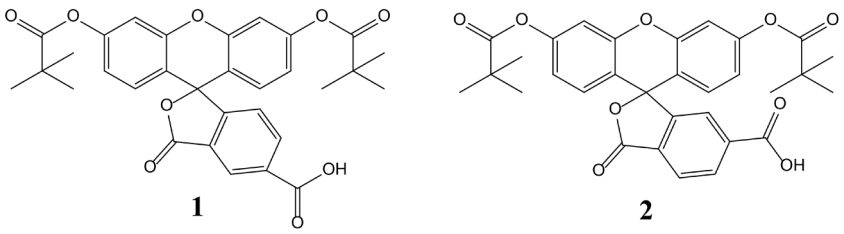


Рис. 1. 5-карбоксифлуоресцеин **1** и 6-карбоксифлуоресцеин **2**

Fig. 1. 5-carboxyfluorescein **1** and 6-carboxyfluorescein **2**

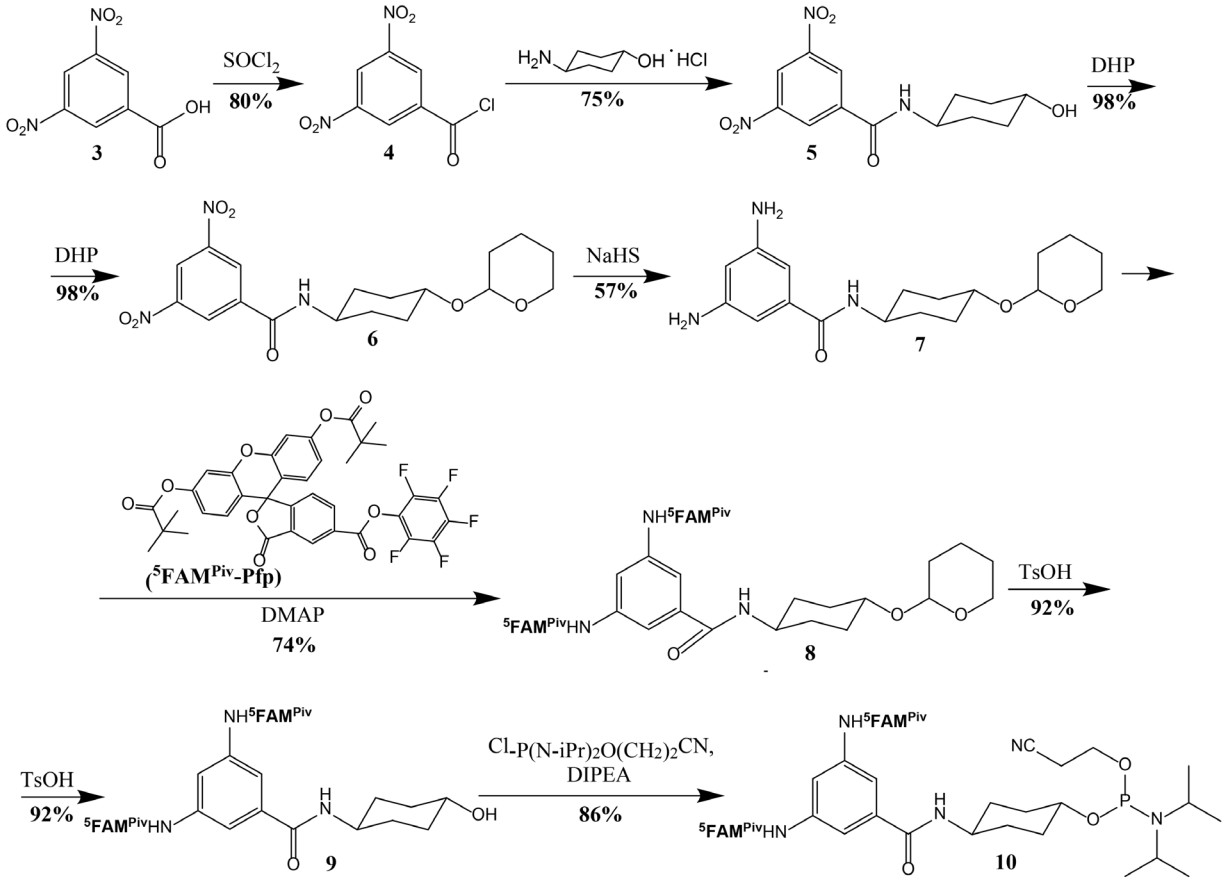


Рис. 2. Схема синтеза амидофосфита дублера **10**, содержащего две молекулы 5-карбоксифлуоресцеина

Fig. 2. Synthesis scheme of amidophosphite of the doubler **10** containing two molecules of 5-carboxyfluorescein

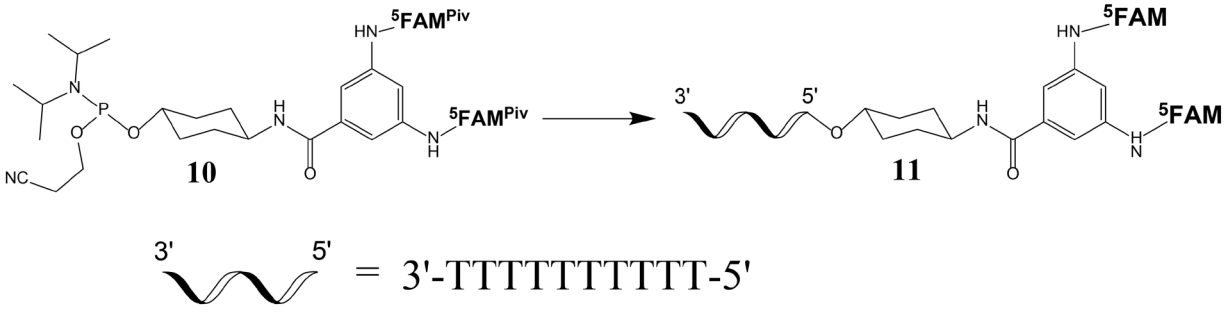


Рис. 3. Получение модифицированного олигонуклеотида **11**

Fig. 3. Preparation of a modified oligonucleotide **11**

агента применяли PyBOP (бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат), широко использующийся в пептидном синтезе [8]. Структура полученного соединения подтверждалась методом ЯМР-спектрометрии. В ходе работы использовали ЯМР-спектрометр (Bruker 500 MHz), синтезатор ASM-800 (Biosset), гель-фильтрационная колонка NAP-10 (GE Healthcare).

Олигонуклеотидный синтез проводили в автоматическом режиме с использованием стандартных амидофосфитов dA^{Bz}, dC^{Bz}, dG^{Ibu}, T по протоколам изготовителя прибора. Конденсацию терминальных амидофосфитов ^{5}FAM и ^{6}FAM осуществляли в течение 5 мин (стадии кэпирования и удаления диметокситритильной группы не проводили). Отщепление олигонуклеотида от носителя и деблокирование осуществляли концентрированным 28%-ным раствором аммиака

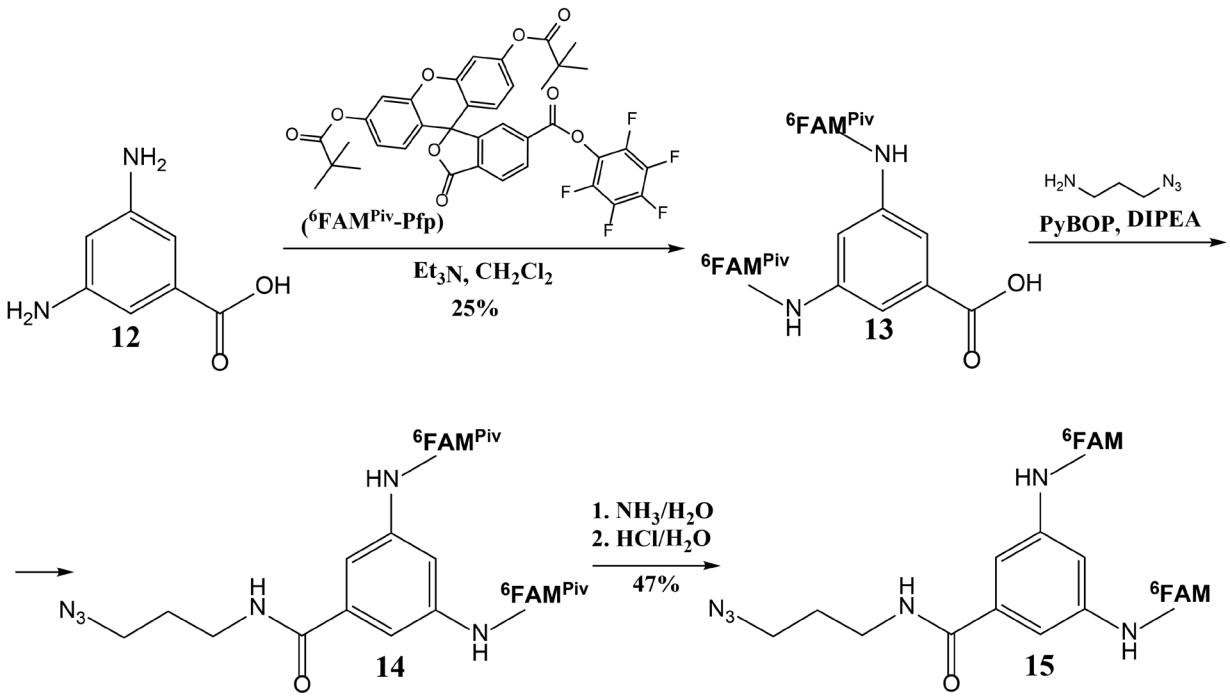


Рис. 4. Синтез азидного производного жесткокаркасного дублера **15**, содержащего 2 молекулы 6-карбоксифлуоресцеина

Fig. 4. Synthesis of azide derivative of the rigid doubler **15**, containing two molecules of 6-carboxyfluorescein

(0,75 мл). После деблокирования полученный раствор очищали при помощи электрофореза в 20%-ном денатурирующем (7 М мочевина) полиакриламидном геле (550 В, 20 мА, контроль по бромфеноловому синему и ксиленцианолу). Олигонуклеотиды визуализировали в геле по поглощению красителя, элюировали 0,5 М $LiClO_4$ в течение 12 ч, отфильтровывали от геля и обессоливали на колонках NAP-10 (GE Healthcare). Полученные олигонуклеотиды дополнительно очищали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии в системе 0,1М ацетат аммония-ацетонитрил (100:0→20:80) на колонке с обращенной фазой Nucleosil (MACHEREY-NAGEL, C18, 4,6/250 мм, размер частиц 5 мк). Концентрацию олигонуклеотидов определяли фотометрически, измеряя поглощение при 260 нм.

Получение 3,5-динитробензоил хлорида **(4)**. Смешивали 3,5-динитробензойную кислоту **3** (3,45 г, 16,27 ммоль) и 2 эквивалента тионилхлорида (2,4 мл, 32,54 ммоль). Затем добавляли 0,2 мл диметилформамида. Смесь нагревали до кипения, пока выделяется хлороводород и диоксид серы. После гомогенизации смесь дополнительно кипятили 20 мин и отгоняли избыток тионил хлорида в вакууме водоструйного насоса. Остаток перегоняли в вакууме 77 ºС при 0,1 мм рт. ст. Получили 3,5-динтробензоил хлорид **4** (3 г, 80%).

Получение N-((1R,4R)-4-гидроксициклогексил)-3,5-динитробензамида **(5)**. К смеси гидрохлорида *транс*-4-аминоциклогексанола (4 г, 26,3 ммоль) и 5 мл воды добавляли гидроксид натрия (1,05 г, 26,3 ммоль). Смесь перемешивали 10 мин, затем добавляли 10 мл тетрагидрофурана и раствор хлорангидрида 3,5-динитробензойной кислоты **4** (2,5 г, 10, 85 ммоль) в 5 мл дихлорметана, при охлаждении до 0 ºС. Смесь перемешивали 20 мин при комнатной температуре, затем снова добавляли гидроксид натрия (1,05 г, 26,3 ммоль) и раствор хлорангидрида 3,5-динитробензойной кислоты 2,2 (2,5 г, 10,85 ммоль) в 5 мл дихлорметана. Смесь перемешивали ночь при комнатной температуре, добавляли 50 мл дихлорметана и органический слой отделяли. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили смесь, которую хроматографировали в системе дихлорметан/метанол (20:1). Получили продукт **5** (5 г, 75%).

R_f 0,3 (метанол-дихлорметан 1:2 об./об.); ^{1}H ЯМР (DMSO-d_6): *δ* 9,04 (д, $J_{2,1}$ = 2,03Гц, 2H, H-2), 8,96 – 8,91 (м, 2H, H-1, O*H*), 4,63 (д, *J* = 4,36 Гц, 1H, OCN*H*CH-3), 3,85 – 3,70 (м, 1H, H-6), 1,92 – 1,81 (м, 4H, H-4e,5e), 1,49 – 1,33 (м, 2H, H-4a), 1,34 – 1,18 (м, 3H, H-3,5a); ^{13}C ЯМР 161,32, 148,14, 137,20, 127,52, 120,68, 68,26, 48,67, 34,08, 30,08.

Получение 3,5-динитро-N-((1R,4R)-4-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)циклогексил)бензамид **(6)**. К раствору **5** (5,0 г, 16,18 ммоль) и дигидропирана (5 мл, 59,0 моль) в 20 мл дихлорметана и 10 мл тетрагидрофурана добавляли метансульфокислоту (0,25мл, 3,87 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре 10 мин, затем кипятили 10 мин. После добавляли триэтиламин (0,5 мл, 3,6 ммоль) и растворитель упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 50 мл дихлорметана и промывали 10 мл насыщенного раствора гидрокарбоната натрия. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили смесь, которую хроматографировали в системе дихлорметан/тетрагидрофуран (5:1). Получили продукт **6** (6,2 г, 97,5%).

R_f 0,8 (метанол-дихлорметан 1:2 об./об.).

Получение 3,5-амино-N-((1R,4R)-4-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)циклогексил)бензамид **(7)**. К кипящему раствору **6** (6,2 г, 15,78 ммоль) в смеси метанол/вода (50 мл/20 мл) по каплям в течение 30 мин добавляли свежеприготовленный раствор гидросульфида натрия (4,0 г, 71,43 ммоль) в 10 мл воды. По окончанию прибавления смесь кипятили 20 мин, затем растворитель упаривали в вакууме и продукт экстрагировали дихлорметаном. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили 4,5 г смеси, которую хроматографировали в системе дихлорметан/метанол/триэтиламин (40:1:1→10:1:1). Получили продукт **7** (3 г, 57%).

R_f 0,37 (метанол-дихлорметан 1:9 об./об.); ^{1}H ЯМР (DMSO-d_6): δ 7,75 (д, *J* = 8.0 Hz, 1H, OCN*H*CH-3), 6,18 (д, *J* = 1,9 Hz, 2H, H-2), 5,92 (т, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-1), 4,85 (с, 4H, NH_2), 4,72 – 4,66 (м, 1H, OC(*H*)OCH_2), 3,81-3,75 (м, 1H, OC(H)OC*Ha или e*), 3,71-3,61 (м, 1H, OCOC*Ha или e*), 3,51-3,45 (м, 1H, H-6), 3,45-3,38 (м, 1H, H-3), 2,01 – 1,94 (м, 1H, OC(O)(H)CH*a или e*), 1,94-1,87 (м, 1H, OC(O)(H)CH*a или e*), 1,83 – 1,74 (м, 2H), 1,74 – 1,65 (м, 1H), 1,63 – 1,54 (м, 1H), 1,51 – 1,38 (м, 4H), 1.37 – 1.25 (м, 2H), 1.25 – 1.13 (м, 2H); ^{13}C (DMSO-d_6) ЯМР δ 167,31, 148,87, 136,75, 102,08, 96,06, 73,57, 61,62, 47,41, 45,49, 32,21, 30,18, 25,14, 19,43, 8,52.

Получение N,N-3,5-диамидо-бис(5-карбоксифлуоресцеин)-N-((1R,4R)-4-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)циклогексил)бензамида **(8)**. К 0,2 мМ раствору **7** (1,28 г, 3,84 ммоль) в дихлорметане добавляли 2,1 эквивалента ДМАП (0,98 г, 8,0 ммоль) и 2,1 эквивалента ДИПЭА (1,38 мл, 8,0 ммоль). Затем добавляли 2,2 эквивалента пивалатзащищенного пентафторфенолового эфира 5-карбоксифлуоресцеина (5,47 г, 8,5 ммоль). Реакционную смесь нагревали до кипения в течение 24 ч, после чего промывали раствором 20 мл 1% HCl. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили 5,85г смеси, которую хроматографировали в системе дихлорметан/ацетон (10:0→8:2). Получили продукт **8** (3,93 г, 74 %) в виде светло-желтой смолы.

R_f 0,23 (ацетон-дихлорметан 1:9 об./об.); ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$) δ 9,52 – 9,22 (м, 1H, H-1 или OCN*H*CH-3), 8,61 – 8,44 (м, 2H), 8,37 – 8,26 (м, 1H, H-1 или OCN*H*CH-3), 8,27 – 8,13 (м, 2H), 7,91 – 7,65 (м, 2H), 7,24 – 7,13 (м, 2H), 7,00 – 6,92 (м, 4H, H-6'), 6,84 – 6,70 (м, 8H, H-4',H-5'), 4,72 – 4,61 (м, 1H), 3,94 – 3,78 (м, 2H), 3,60 – 3,51 (м, 1H), 3,50 – 3,39 (м, 1H), 2,10 – 1,90 (м, 2H), 1,85 – 1,74 (м, 1H), 1,71 – 1,61 (м, 1H), 1,58 – 1,44 (м, 4H), 1,34 (с, 36H, C(CH_3)$_3$), 1,29 – 1,18 (м, 6H).

Получение N-((1R,4R)-4-гидроксициклогексил)-N,N-3,5-диамидо-бис(5-карбоксифлуоресцеин)бензамида **(9)**. К раствору **8** (3,78 г, 2,72 ммоль) в смеси дихлорметана с метанолом (10 мл/10 мл) добавляли 0,03 эквивалента п-толуолсульфокислоты (15,5 мг, 0,082 ммоль). Раствор кипятили в течение часа, затем отгоняли растворители и разбавляли сухой остаток 50 мл дихлорметана. Органическую фазу промывали 20 мл 2 М $KHCO_3$ и 20 мл насыщенного NaCl, пропускали через фильтр с безводным сульфатом натрия, растворитель отгоняли в вакууме. Получили 3,5 г смеси, которую хроматографировали в системе дихлорметан/ацетон (9:1→8:2). Получившееся вещество дополнительно перекристаллизовали из метанола и получили продукт **9** (3,26г, 92%) в виде белых кристаллов.

R_f 0,26 (ацетон-дихлорметан 2:8 об./об.); ^{1}H NMR (CD_3CN) δ 9,54 – 9,27 (м, 1H, H-1 или OCN*H*CH-3), 8,58 – 8,43 (м, 2H), 8,43 – 8,29 (м, 1H, H-1 или OCN*H*CH-3), 8,29 – 8,12 (м, 2H), 7,89 –

7,69 (м, 2H), 7,32 – 7,17 (м, 2H), 7,09 – 6,95 (м, 4H, H-6'), 6,87 – 6,68 (м, 8H, H-4',H-5'), 3,77 – 3,66 (м, 1H), 3,47 – 3,35 (м, 1H), 2,84 – 2,73 (м, 1H), 1,91 – 1,75 (м, 4H), 1,30 (с, 36H, C(CH_3)$_3$), 1,24 – 1,11 (м, 4H).

Получение N,N-3,5-диамидо-бис(5-карбоксифлуоресцеин)-N-((1R,4R)-4-((цианэтилдиизопропилфосфорамидит)окси)циклогексил)бензамида **(10)**. Раствор **9** (1,304 г, 1,0 ммоль) соупаривали с сухим дихлорметаном 2 раза в вакууме, растворяли в 15 мл дихлорметана, при перемешивании добавляли ДИПЭА (210 мкл, 1,2 ммоль) и по каплям 2-цианэтокси-*N,N*-диизопропиламинохлорофосфин (246 мкл, 1,1 ммоль). Через 1,5 ч смесь разбавляли до 100 мл дихлорметаном, промывали смесью насыщенных растворов хлорида и гидрокарбоната натрия (2 × 50 мл/50 мл). Сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и отгоняли растворитель в вакууме и получили вещество (2,1 г). Хроматографировали в системе дихлорметан/триэтиламин (99:1).

Получили вещество **10** (1,6 г). Данное вещество растворяли в 5 мл дихлорметана, и прикапывали к охлажденному до 0 ºС петролейному эфиру (300 мл) при перемешивании. Выпал осадок, который отфильтровывали. Выход продукта **10** – 1,3 г, 86%.

R_f 0,46 (ацетон-триэтиламин-дихлорметан 1:1:9 об./об./об.); ^{1}H ЯМР (CD_3CN) δ 9,61 – 9,36 (м, 1H, H-1 или OCN*H*CH-3), 8,61 – 8,42 (м, 2H), 8,42 – 8,30 (м, 1H, H-1 или OCN*H*CH-3), 8,29 – 8,10 (м, 2H), 7,92 – 7,70 (м, 2H), 7,32 – 7,15 (м, 2H), 7,09 – 6,98 (м, 4H, H-6'), 6,87 – 6,66 (м, 8H, H-4',H-5'), 3,87 – 3,62 (м, 4H, H-3, H-6, OCH_2CH$_2$CN), 3,61 – 3,43 (м, 2H), 2,64 – 2,53 (м, 2H), 2,31 – 2,17 (м, 2H), 1,92 – 1,81 (м, 2H), 1,30 (с, 36H, C(CH_3)$_3$), 1,24 – 1,18 (м, 4H), 1,16 – 1,06 (м, 12H, CH(CH_3)$_2$).

Получение 3,5-бис(3-оксо-3',6'-бис(пивалоилокси)-3H-спиро[изобензофуран-1,9'-ксантен]-6-илкарбоксиамидо)бензойная кислота **(14)**. К 0,2 мМ раствору 3,5-диаминобензойной кислоты **13** (500 мг, 3,3 ммоль) в N,N-диметилформамиде добавляли 2,1 эквивалент ДМАП (0,84 г, 6,9 ммоль) и 3,1 эквивалента ДИПЭА (1,75 мл, 10,2 ммоль). Затем добавляли 2,2 эквивалента пентафторфенилового эфира пивалатзащищенного 6-карбоксифлуоресцеина (4,9 г, 6,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 12 ч, после чего ее вливали в 150 мл 1%-ного раствора HCl. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали дистиллированной водой 3×25 мл. Осадок растворяли в хлористом метилене и сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали, растворитель отгоняли в вакууме. Получили 6,65 г смеси, которую хроматографировали в системе толуол/ацетон (10:0→9:1). Получили продукт **14** (0,98г, 25%) в стеклообразного твердого вещества.

R_f 0,75 (ацетон-толуол 2:8 об./об.); ^{1}H ЯМР (CD_3CN) δ 9.12 (м, 2H), 8.46 (м, 1H), 8.11 (м, 2H), 8.05 (д, J = 8.0 Hz, 2H), 7.69 (м, 2H), 7.03 (м, 2H), 6.81 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 6.71 (д, J = 7.4 Hz, 2H), 1.31 (s, 36H).

Получение 3-азидопропил 3,5-бис(3',6'-дигидрокси-3-оксо-3H-спиро[изобензофуран-1,9'-ксантен]-6-илкарбоксиамидо)бензоат **(15)**. К раствору соединения **14** (250 мг, 0,2 ммоль) в 10 мл дихлорметана добавляли 2 эквивалента ДИПЭА (70 мкл, 0,4 ммоль) и 1 эквивалент бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат (103,5 мг, 0,2 ммоль). При перемешивании смеси в течение 10 мин добавляли раствор 1 эквивалента аминопропил-3-азида (20 мкл, 0,2 ммоль) в 1 мл дихлорметана. Через час раствор разбавляли до 50 мл и промывали дистиллированной водой (2×20 мл), насыщенными растворами гидрокарбоната натрия (20 мл) и хлорида натрия (20 мл). Сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и отгоняли растворитель в вакууме и получили 290 мг смеси, которую хроматографировали в системе толуол/ацетон (10:0→9:1). Полученный продукт (126 мг) в стеклообразного твердого вещества. R_f 0,65 (ацетон-толуол 2:8 об./об.). Далее полученное соединение растворяли в 3 мл ацетона и к полученному раствору добавляли 1 мл 25%-ного водного раствора аммиака. После часа перемешивания из реакционной среды удаляли ацетон и избыток аммиака на роторном испарителе. Раствор разбавляли до 2 мл дистиллированной водой и добавляли 10%-ный раствор хлороводородной кислоты, выпавший кристаллический осадок отфильтровали и промыли дистиллированной водой. Полученные кристаллы высушивали, получили 90 мг продукта **15** с выходом 47%.

R_f 0,8 (ацетон-толуол 3:2 об./об.); ^{1}H ЯМР (CD_3OD) δ 8.33 – 7.95 (м, 5H), 7.81 – 7.50 (м, 6H), 7.03 (м, 5H), 6.77 (м, 7H), 0.94 – 0.81 (м, 3H).

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. ПЦР «В реальном времени» / Д. В. Ребриков [и др.]. – М., БИНОМ, 2009.

2. Wilson, J. N. Efficient Quenching of Oligomeric Fluorophores on a DNA Backbone / J. N. Wilson, Y. N. Teo, E. T. Kool // J. Am. Chem. Soc. – 2007, Vol. 129. – P. 15426–15427.

3. Synthesis of dye/fluorescent functionalized dendrons based on cyclotriphosphazene / A. Hameau [et al.] // Beilstein journal of organic chemistry. – 2011. – Vol. 7, №. 1. – P. 1577–1583.

4. Labeling of antibodies with Cy3-, Cy3. 5-, Cy5-, and Cy5. 5-monofunctional dyes at defined dye/protein ratios / C. D. Hahn, C.K. Riener, H.J. Gruber // Single Molecules. – 2001. – Vol. 2, №. 2. – P. 149–159.

5. Martin, V. V. Amplified fluorescent molecular probes based on 1, 3, 5, 7-tetrasubstituted adamantine / V. V. Martin, I. S. Alferiev, A. L. Weis // Tetrahedron letters. – 1999. – Vol. 40, № 2. – P. 223–226.

6. Misra, A. Synthesis and Fluorescence Studies of Multiple Labeled Oligonucleotides Containing Dansyl Fluorophore Covalently Attached at 2′-Terminus of Cytidine via Carbamate Linkage / A. Misra, S. Mishra, K. Misra // Bioconjug. Chem. – 2004. – Vol. 15. – P. 638–646.

7. Титце, Л. Препаративная органическая химия. Реакции и синтезы в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории / Л. Титце, Т. Айхер. – М.: Мир, 1999. – 704 с.

8. Novel Non-Nucleosidic Building Blocks for the Preparation of Multilabeled Oligonucleotides / A. Guzaev [et al.] // Bioconjugate Chem. – 1996. – Vol. 7. – P. 240–248.

References

1. Rebrikov D. V., Samatov G. A., Trofimov D. Iu., Semenov P. A., Savilova A. M., Kofiadi I. A., Abramov D. D., *PTsR v real'nom vremeni* [Real-time PCR], in Rebrikov D. V. (ed.), 2nd ed., BINOM. Laboratoriia znanii, Moscow, RU, 2009.

2. Wilson J.N., Teo Y.N., Kool E.T., "Efficient Quenching of Oligomeric Fluorophores on a DNA Backbone", *Journal of the American Chemical Society*, 2007, vol. 129, pp. 15426–15427.

3. Hameau A., Fuchs S., Laurent R., Majoral J.-P., Caminade A.-M., "Synthesis of dye/fluorescent functionalized dendrons based on cyclotriphosphazene", *Beilstein journal of organic chemistry*, 2011, vol. 7, no. 1, pp. 1577–1583.

4. Hahn C. D., Riener C. K., Gruber H. J., "Labeling of antibodies with Cy3-, Cy3. 5-, Cy5-, and Cy5. 5-monofunctional dyes at defined dye/protein ratios", *Single Molecules*, 2001, vol. 2, no. 2, pp. 149–159.

5. Martin V. V., Alferiev I. S., Weis A. L., "Amplified fluorescent molecular probes based on 1, 3, 5, 7-tetrasubstituted adamantine", *Tetrahedron letters*, 1999, vol. 40, no. 2, pp. 223–226.

6. Misra A., Mishra S., Misra K., "Synthesis and Fluorescence Studies of Multiple Labeled Oligonucleotides Containing Dansyl Fluorophore Covalently Attached at 2′-Terminus of Cytidine via Carbamate Linkage", *Bioconjugate Chemistry*, 2004, vol. 15, pp. 638–646.

7. Tietze L., Eicher T., *Preparativnaia organicheskaia khimiia. Reaktsii i sintezy v praktikume organicheskoi khimii i nauchno-issledovatel'skoi laboratorii* [Preparative organic chemistry. Reactions and syntheses in the workshop of organic chemistry and research laboratory], Mir, Moscow, RU, 1999.

8. Guzaev A., Salo H., Azhayev A., Lönnberg H., "Novel Non-Nucleosidic Building Blocks for the Preparation of Multilabeled Oligonucleotides", *Bioconjugate Chemistry*, 1996, vol. 7, pp. 240–248.

Информация об авторах

Мартыненко-Макаев Юрий Владимирович - магистр хим. наук, мл. науч. сотрудник, аспирант, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yrmart@gmail.com.

Удодова Виктория Витальевна – магистрант, мл. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vika.udodova@tut.by.

Брылёв Владимир Анатольевич – аспирант, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской Академии наук (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117997, Москва, Российская Федерация).

Information about the autors

Yury V. Martynenko-Makaev – M. Sc. (Chemistry), Junior researcher, Ph. D. student, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yrmart@gmail.com.

Viktoryia V. Udodava – Master student, 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: vika.udodova@tut.by.

Vladimir A. Brylev – Ph. D. student, M.M. Shemyakin and Yu.A. Oychinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (16/10, Miklukho-Maklaya, 117997, Moscow, Russian Federation).

ISSN 1561-8331(print.)
УДК 577.112.083

Поступила в редакцию 20.02.2017
Received 20.02.2017

С. Б. Станишевский, А. В. Иванчик, М. А. Шапиро, А. В. Янцевич, А. Г. Сыса

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

БЕЛКОВОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КЛЕТОК HepG2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ «SHOTGUN» ПРОТЕОМИКИ КАК МЕТОД, ПРИМЕНИМЫЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПТАТОВ

Аннотация: Описаны результаты применения «Shotgun» протеомного подхода в анализе микрограммовых количеств биологического материала с целью идентификации специфических белковых маркеров в клеточной линии высокодифференцированной гепатоцеллюлярной карциномы HepG2.

Ключевые слова: «Shotgun» протеомика, HepG2, белковое профилирование биомаркеры, белки-мишени

Для цитирования: Белковое профилирование клеток HepG2 с использованием «Shotgun» протеомики как метод, применимый для исследования биоптатов / С. Б. Станишевский [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 79–84.

S. B. Stanisheuski, A. V. Ivanchyk, M. A. Shapira, A. V. Yantsevich, A. G. Sysa

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

SHOTGUN PROTEOMIC PROFILING OF HepG2 CELL LINE AS A METHOD APPLICABLE FOR BIOPSY SPECIMEN ANALYSIS

Abstract: The results of shotgun proteomic analysis of microgram quantities of hepatocellular carcinoma cells (HepG2) are described. Identified is a number of proteins which have been reported to be biomarkers and therapy targets.

Keywords: shotgun proteomics, HepG2, proteomic profiling, biomarkers, therapy targets

For citation: Stanisheuski S. B., Ivanchyk A. B., Shapira M. A., Yantsevich A. B., Sysa A. G. Shotgun proteomic profiling of HepG2 cell line as a method applicable for biopsy specimen analysis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 79–84 (In Russian).

Введение. Протеомный анализ образцов, полученных при биопсии злокачественных опухолей – перспективный и высокотехнологичный подход, используемый для определения типа опухоли и ее резистентности к предполагаемому виду терапии. Возможность таких исследований появлялась еще в 1980-х годах после разработки «мягких» методов ионизации: «электрораспыления» (ESI) и «лазерной десорбции-ионизации при содействии матрицы» (MALDI). В настоящее время такие исследования стали возможны исключительно в результате самых последних достижений в области протеомных технологий и в первую очередь в тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Новейшие подходы позволили исследовать биохимические процессы в раковых клеточных линиях и в организме животных. Также был достигнут прогресс в анализе посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и убиквитинирование. Доступность различных видов изотопных методов открыла возможность количественного анализа протеома [1].

Однако еще много препятствий необходимо преодолеть, чтобы применять масс-спектрометрическое профилирование в медицине, в частности, для исследования образцов, полученных при биопсии злокачественных опухолей. Основные затруднения в работе с биоптатами связаны с несколькими причинами. Во-первых, в микроокружении опухоли почти всегда присутствуют клетки различных типов тканей, например сосудистой, нервной, соединительной, а также клетки иммунной системы. Во-вторых, в результате клональной эволюции часто наблюдается генетическое разнообразие внутри одной опухоли, что приводит к появлению клеточных субпопуляций с различающимися протеомами и соответственно со своими характерными свойствами и функциональностью. В-третьих, один из самых важных вопросов трансляционной медицины – стандартизация используемых процедур, имеющих существенное значение в использовании масс-спектрометрии. Даже при четком однообразном выполнении всех процедур конечные ре-

зультаты могут отличаться, например, по причине не поддающихся регулировке незначительных отклонений в работе приборов. В связи с этим далеко не всегда можно гарантировать, что анализ одной единственной пробы материала, отобранного у пациента, будет достоверным. В-четвертых, большинство методов протеомики, использующих масс-спектрометрическое определение, для разделения белков используют электрофорез в полиакриламидном геле, что приводит к значительным потерям материала в результате адсорбции белков на поверхности геля. Работа с образцами, полученными при биопсии (≈100 мкг), требует специальных подходов, не допускающих потери материала и при этом обеспечивающих качественное определение необходимых биомаркеров и белков-мишеней [2].

В качестве биологического материала, аналогичного биоптатам реальных пациентов, удобно использовать раковые клеточные линии. В ходе их наработки есть возможность выбрать требуемый объем материала и подходящие для отработки дальнейшей пробоподготовки условия культивирования. С учетом всего вышесказанного цель данного исследования – установление белкового состава раковой клеточной линии HepG2, определение протеома раковой клеточной линии HepG2 с использованием только негелевого (хроматографического) разделения. При этом все этапы пробоподготовки выбирались с учетом упомянутых выше параметров так, чтобы они были применимыми для пробоподготовки образцов биологического материала, отобранных в ходе биопсии [3].

Использованные материалы. NaOH, HCl, NaCl, этилендиаминотетрауксусная кислота, K_2HPO_4, NH_4HCO_3, этанол, трихлоруксусная кислота, диметилсульфоксид («Реахим», Россия); дитиотрейтол (ДТТ) («Serva», Германия); сыворотка крупного рогатого скота (ООО «БиолоТ», Россия); трипсин, среда для культур клеток EMEM, HEPES, трифторуксусная кислота, ацетонитрил, метанол, хлороформ, ацетон, йодацетамид, ацетонитрил (АЦН), мочевина, тиомочевина, гептафтормасляная кислота (ГФМК), Трис, муравьиная кислота («Sigma», США).

Для твердофазной экстракции использовали ТФЭ-картриджи C18-Hydra, содержащие 100 мг сорбента (Agilent, США) (100 мг). В работе применяли клеточную линию HepG2 – клетки высокодифференцированной гепатоцеллюлярной карциномы.

Культивирование клеточной линии HepG2. В работе монослойную клеточную культуру HepG2 культивировали по модифицированному протоколу [4] в среде EMEM, содержащей 20 мМ HEPES, 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37 ºС во влажной атмосфере с 5% CO_2. Клеточную культуру поддерживали на стадии логарифмического роста путем рутинного субкультивирования трижды в неделю.

Перед снятием клеток их дважды промывали раствором Версена, снятие клеток проводили с использованием трипсина 0,25%. Для нейтрализации трипсина добавляли девятикратный избыток ростовой среды. Клетки осаждали путем центрифугирования, супернатант отбирали, а затем промывали осадок с использованием калий-фосфатного буфера. Процедуру повторяли дважды.

Хлороформ-метанольное осаждение белков. К водной взвеси клеток объемом 300 мкл добавляли 400 мкл метанола и 200 мкл хлороформа, тщательно перемешивали (5 мин на шейкере при максимальных оборотах) и помещали на час в морозильную камеру при температуре на –24 ºС, для увеличения выхода белка.

После указанного инкубирования смесь извлекали из морозильной камеры, повторно перемешивали (5 мин на шейкере при максимальных оборотах) и центрифугировали в течение 15 мин при 4 ºС на скорости 13 400 об./мин. После этого верхний слой извлекали, а к оставшейся двухфазной смеси добавляли 600 мкл метанола. Образец аккуратно встряхивали и центрифугировали 15 мин при 4 ℃ на скорости 13400 об./мин. После чего супернатант удаляли, а осадок (состоящий преимущественно из белка) подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 10 мин. При необходимости доочистить белковую фракцию процедуру выделения повторяли.

Трипсинолиз смеси белков. Белковый осадок, полученный согласно описанной выше методике, перерастворяли в 150 мкл 9 М мочевины и инкубировали на шейкере при 30 ºС на скорости 550 об./мин. Далее к раствору добавляли 20 мкл 50 мМ раствора ДТТ и инкубирование повторяли. После этого к смеси добавляли 20 мкл 150 мМ йодацетамида и оставляли на час при комнат-

ной температуре в темноте. Затем в раствор добавляли 800 мкл 0,1 М раствора гидрокарбоната аммония (pH 8,0) и 10 мкл раствора трипсина (1 мг/мл в 0,1 М растворе гидрокарбоната аммония (pH 8,0)). Полученную смесь инкубировали в течение ночи (16 ч) при комнатной температуре в темноте.

По прошествии необходимого времени в образец вносили 12 мкл 10% ГФМК, затем центрифугировали и подвергали твердофазной экстракции (ТФЭ).

Пробоподготовка образца для хроматографии. Колонки для ТФЭ уравновешивали последовательным нанесением 2 мл АЦН, 2 мл воды и 0,5 мл 10 мМ раствора ГФМК. После этого на колонку наносили подкисленный, отцентрифугированный образец (супернатант после центрифугирования – 15 мин при 4 ºС на скорости 13400 об./мин). После прохождения образца, колонку промывали 0,5 мл 0,7%-ным раствором муравьиной кислоты и 0,5 мл воды. После чего колонку просушивали током воздуха в течение 10–15 мин (использовали вакуумный насос с величиной вакуума в сосуде 2,5–3 атм.). Элюирование образцов производили 60%-ным раствором АЦН, содержащим 0,1 М FABS-буфер (pH 2,0).

Полученный элюат фильтровали через 0,2 мкм политетрафторэтиленовый фильтр и закладывали (5 мкл) в хроматограф.

Разделение и анализ пептидной смеси. Для протеомного анализа использовали высокоэффективный хроматограф (Agilent-1290, США) с тандемным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (Agilent, США). Разделение проводили на колонке ZORBAX Extend-C18 (длина – 50 мм, внутренний диаметр – 2,1 мм, диаметр пор – 1,8 мкм). Разделение проводили в градиенте АЦН/МеОН/вода. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Spectrum Mills.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований были идентифицированы более 70 белков (таблица) в образцах раковой клеточной линии HepG2, содержащих $1{,}5\times10^7$ клеток. По приблизительным оценкам такой объем материала (около 60 мкг) соответствует отбираемому при биопсии. Многие из обнаруженных белков являются установленными ранее биомаркерами злокачественных образований.

Список белков, идентифицированных в клетках HepG2

List of proteins identified in the HepG2 cells

Название белка	Идентификационный номер в базе данных SwissProt	Интенсивность сигнала, отн. ед.	Количество обнаруженных пептидов	Степень покрытия аминокислотной последовательности, %
Белок теплового шока с молекулярной массой 60 кДа, митохондриальный	P10809	8.35e+006	9	25.4
Актин, цитоплазматический	P63261	5.66e+006	10	36.5
Предполагаемый 1-альфа подобный фактор элонгации	Q5VTE0	2.88e+006	7	24.2
Бета субъединица тубулина	P07437	2.55e+006	6	20
Глицераль-3-фосфат дегидрогеназа	P04406	2.10e+006	5	22
Альфа-1C субъединица тубулина	F5H5D3	3.32e+006	5	14.8
Синтаза жирных кислот	P49327	1.74e+006	5	4
Фактор элонгации 2	P13639	1.31e+006	4	9.3
Альфа-енолаза	P06733	1.78e+006	4	18.2
Кератин, тип II, цитоскелетный	P05787	1.58e+006	4	15.3
Гистон H2A тип 1-B/E	P04908	6.65e+006	3	43.8
Гистон H2A тип 2-A	Q6FI13	4.78e+006	3	43.8
Кератин, тип I, цитоскелетный	P05783	8.57e+005	2	11.1
Белок регулятор метаболизма глюкозы с молекулярной массой 78 кДа	P11021	1.25e+006	3	7.3
Протеиндисульфид-изомераза A6	Q15084	1.28e+006	3	9
Бета субъединица белка теплового шока с молекулярной массой 90 кДа	P08238	9.17e+005	3	7.3
Триозофосфатизомераза	P60174	8.18e+005	2	15.3
Гистон H2B	U3KQK0	6.49e+006	2	14.4
Протеиндисульфид-изомераза	P07237	1.12e+006	2	8.8
Альфа субъединица L-лактатдегидрогеназы	P00338	1.81e+006	3	9.6
Кофилин-1	E9PK25	8.45e+005	2	20.5
Бета субъединица АТФ-синтазы, митохондриальный	P06576	1.41e+006	2	10
Эукариотический фактор инициации трансляции 4A-II	Q14240	6.61e+005	2	5.6
Альдокеторедуктаза 1C1	Q04828	8.69e+005	2	8.3
Нуклеозиддифосфаткиназа	Q32Q12	2.98e+005	2	9.9
Белок 14-3-3 эпсилон	P62258	5.20e+005	2	10.5
Тяжелая субъединица клатрина	A0A087WVQ6	3.97e+005	2	1.5

Окончание таблицы

Название белка	Идентификационный номер в базе данных SwissProt	Интенсивность сигнала, отн. ед.	Количество обнаруженных пептидов	Степень покрытия аминокислотной последовательности, %
Белок теплового шока с молекулярной массой 40кДа	P62081	2.33e+005	2	17.5
Гистон H4	P62805	1.58e+006	2	19.4
Белок 14-3-3 дзета/дельта	E7EX29	4.30e+005	2	10.9
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин K	P61978	5.17e+005	2	5.8
Пероксиредоксин	Q06830	4.01e+005	2	10
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2/B1	P22626	4.63e+005	1	4.5
Гистон H3.3	K7ES00	2.64e+006	2	10.5
Белок 1 Т-комплекса, субъединица η	Q99832	5.16e+005	1	2.9
Калретикулин	P27797	4.12e+005	1	6.9
Предположительно фосфоглицерат мутаза класс 4	Q8N0Y7	1.11e+006	1	7
Белок 14-3-3 дзета	P27348	4.46e+005	2	11
Гипоксия-индуцируемый белок 1	Q9Y4L1	5.66e+005	1	1.9
Нуклеолин	P19338	3.13e+005	1	3
Глюкоза-6-фосфат изомераза	A0A0A0MTS2	3.74e+005	1	2.6
Кератин, тип I, цитоскелетный	P08727	1.44e+006	1	5.7
Белок асоциированный с белками теплового шока с молекулярной массой 71кДа	P11142	3.23e+005	1	4.1
Рибозо-фосфат пирофосфокиназа 1	P60891	1.53e+005	1	4.7
Профилин-1	P07737	4.65e+005	1	10
Альдегиддегидрогеназа X, митохондриальная	P30837	1.61e+005	1	2.7
Сульфотрансфераза	A0A0A6YYL2	1.92e+005	1	6.9
Альфа-актинин-3	A0A087WSZ2	4.92e+005	1	1.2
Белок HSPE1-MOB4	S4R3N1	1.02e+006	1	5.3
Аденилил циклаза асоциированный белок 1	Q01518	2.29e+005	1	3.7
Полиаденилат-связывающий белок 4	Q13310	2.85e+005	1	3.7
Субъединица C1q белка системы комплемента	Q07021	3.74e+005	1	10.6
Трехфункциональный фермент, субъединица альфа, митохондриальный	P40939	2.40e+005	1	1.9
Малый ядерный рибонуклеопротеин	P62314	3.83e+005	1	16.8
Ретинальдегидрогеназа 1 Sm D1	P00352	6.41e+005	1	2.5
40 S Рибосомальный белок	A0A0C4DG17	1.96e+005	1	4.3
Катепсин Д	P07339	3.24e+005	1	2.4
Пептидил-пролили цис-транс изомераза A-подобный белок 4A/B/C	Q9Y536	1.80e+005	1	8.5
60 S рибосомальный белок Л13	P26373	2.16e+005	1	6.1
40 S рибосомальный белок S2	P15880	1.40e+005	1	6.4
ТЕР АТФаза	P55072	1.67e+005	1	2.1
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин C1/C2	P07910	2.59e+005	1	3.9
НАД(Ф)Н дегидрогеназа	P15559	2.03e+005	1	3.6
Пируваткиназа	P14618	6.35e+005	1	1.5
4-аминобутираттрансфераза, митохондриальная	H3BRN4	1.85e+005	1	2.3
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1	P09651	5.31e+005	1	4.3
Альдегиддегидрогеназа, митохондриальная	P05091	2.26e+005	1	2.7
Нуклеофосмин	P06748	2.51e+005	1	7.1
Ингибитор миграции макрофагов	P14174	2.50e+005	1	7.8
Карбоксилэстераза печени	P23141	4.04e+005	1	2.9
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A3	P51991	1.59e+005	1	4.2
Хиноноксиредуктаза	Q08257	1.00e+005	1	4.8

При рассмотрении таблицы можно отметить повышенную выработку в клетках HepG2 белков-шаперонов семейств HSP 60 и HSP 90. Эти белки являются биомаркерами для многих типов рака. Причем в некоторых типах рака мочевого пузыря было показано, что степень дифференциации ткани опухоли коррелирует с количеством вырабатываемых белков HSP 60 и HSP 90 и при этом именно с пониженной выработкой этих белков. Также существует корреляция уровня выработки HSP 60 и HSP 90 с тем, насколько будет благоприятен прогноз при лечении конкретных пациентов [5]. В случае же клеток печени, биомаркером является в свою очередь повышенная выработка HSP 60 и HSP 90, которая также определяет и степень дифференциации ткани [6]. Важность этих биомаркеров была показана и в других исследованиях. На данный момент уровень и локализация в клетке их выработки в совокупности с определенным типом рака позволяет выбрать правильное лечение и предсказать наиболее вероятный результат такого лечения.

Еще один белок-шаперон HSC 70 положительно влияет на скорость роста и пролиферации клеток рака молочной железы, экспрессирующих Катепсин Д в больших количествах. Вследствие этого HSC 70 является целью для препаратов химиотерапии нового поколения [7].

В связи с тем что исследуемые клетки HepG2 являются клетками печени, нельзя не отметить, что многие из обнаруженных белков в профиле этих клеток – ферменты фазы II метаболизма.

Белки фазы II метаболизма являются определяющими для метаболизма многих антинеопластических препаратов, принцип действия которых основан на наличии или отсутствии конкретных ферментов в конкретном типе клеток [8]. Так, повышенное содержание альдегиддегидрогеназы (таблица) отвечает за резистентность опухоли к целому ряду неопластических препаратов производных оксазафосфорина [9]. Знание о том, что исследуемый тип клеток способен вырабатывать такие белки, дает возможность предсказать эффективность лекарств и побочные эффекты от их применения.

Иногда механизм влияния наличия или отсутствия некоторых белков на здоровье пациента не выявлен, но существует статистически значимая закономерность между наличием белка и результатом терапии. Так, обнаруженный нами белок 14-3-3ζ является биомаркером, позволяющим уточнить прогноз по лечению мультиформной глиобластомы. Как показали авторы работы [10], при сравнении группы пациентов, у которых этот белок не экспрессировался, и группы пациентов, у которых он экспрессировался, прожили в среднем на полгода дольше после операции, при этом шанс пережить первые два года отличался между группами почти вдвое (8,6 и 16,3% для каждой из групп соответственно).

В данной работе в протеоме клеточной линии HepG2 идентифицированы такие белковые онкомаркеры, как белки семейства HSP, белок 14-3-3ζ, а также белки-мишени для химиотерапии: белок-шаперон HSC 70 и катепсин Д. Для идентификации использовали метод панорамного протеомного анализа. Основными достоинствами использованного подхода являются: возможность одновременного определения в сжатые сроки множества целевых белков, отсутствие ограничений по форме исследуемого материала, возможность работы с микрограммовыми количествами. Этот подход может быть использован при работе с биоптатами любого типа ткани, отобранными у пациентов, и может применяться как один из методов ранней диагностики или прогнозирования лечения онкологических заболеваний.

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. Quantitative Mass Spectrometric Profiling of Cancer-cell Proteomes Derived From Liquid and Solid Tumors / H. Bohnenberger [et al.] // J. of Visualized Experiments. – 2015. – Vol. 96. – P. 52435.

2. Feist, P. Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples / P. Feist, A. B. Hummon // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16(2). – P. 3537–3563.

3. Оптимизация проведения отдельных стадий пробоподготовки в протеомном анализе /А.В. Иванчик [и др.] // Сб. науч. ст. Первого Белорусского биохимического конгресса. – Гродно: ЮрСаПринт, 2016. – Ч. 2. – С. 169–174.

4. HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.hepg2.com. Дата доступа: 10.11.16.

5. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90 expression in bladder carcinoma / T. Lebret [et al.] // Cancer. – 2003. – Vol. 98(5). – P. 970–977.

6. Proteomic Characterization of Annexin l (ANX1) and Heat Shock Protein 27 (HSP27) as Biomarkers for Invasive Hepatocellular Carcinoma Cells / Ruo-Chiau Wang [et al.] // Journal Pone. – 2015. – Vol. 10. – P. 2–10.

7. Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. / P. Nirdé [et al.] // Oncogene. – 2010. – Vol. 29. – P. 117–127.

8. Prodrugs from serendipity to rational design / K. M. Huttunen [et al.] // Pharmacological Reviews. – 2011. – Vol. 63 (3). – P. 750–761.

9. Pinto, N. Drug focus: Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy / N. Pinto // Pharmacogenomics. – 2009. – Vol. 10. – P. 1897–1903.

10. 14-3-3ζ positive expression is associated with a poor prognosis in patients with glioblastoma. / X. Yang [et al.] // Neurosurgery. – 2011. – Vol. 68(4). – P. 932–938.

References

1. Bohnenberger H., Ströbel P., Mohr S., Corso J., Berg T., Urlaub H., Lenz C., Serve H., Oellerich T., “Quantitative Mass Spectrometric Profiling of Cancer-cell Proteomes Derived From Liquid and Solid Tumors”, *Journal of Visualized Experiments*, 2015, vol. 96, p. 52435.

2. Feist P., Hummon A. B., “Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples”, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16(2), pp. 3537–3563.

3. Ivanchyk A. V., Shapira M. A., Shchur V. V., Iantsevich A. V., "Optimization of separate stages of sample preparation in proteomic analysis", *Sovremennye problemy biokhimii : sbornik nauchnykh statei I Belorusskogo biokhimicheskogo kongressa, Grodno, 5–6 iiulia 2016 g. : v 2 chastiakh, Nadol'nik L. I. (gl. red.), Grodno, 2016* [Modern problems of biochemistry: a collection of scientific articles of the I Belorussian Biochemical Congress, Grodno, July 5–6, 2016: in 2 parts, Nadolnik L. I. (ed.), Grodno, 2016], IurSaPrint, Grodno, BY, 2016, part 2, pp. 169–174.

4. "HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol", Available at: http://www.hepg2.com, (accessed 10.11.16).

5. Lebret T., Watson R. W., Molinié V., O'Neill A., Gabriel C., Fitzpatrick J. M., Botto H., "Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90 expression in bladder carcinoma", *Cancer*, 2003, vol. 98(5), pp. 970–977.

6. Wang R. C., Huang C. Y., Pan T. L., Chen W. Y., Ho C. T., Liu T. Z., Chang Y. J., "Proteomic Characterization of Annexin l (ANX1) and Heat Shock Protein 27 (HSP27) as Biomarkers for Invasive Hepatocellular Carcinoma Cells", *PLoS One*, 2015, vol. 10, pp. 2–10.

7. Nirde P., Derocq D., Maynadier M., Chambon M., Basile I., Gary-Bobo M., Garcia1 M., "Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells", *Oncogene*, 2010, vol. 29, pp. 117–127.

8. Huttunen K. M., Raunio H., Rautio J., "Prodrugs from serendipity to rational design", *Pharmacological Reviews*, 2011, vol. 63 (3), pp. 750–761.

9. Pinto N., "Drug focus: Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy", *Pharmacogenomics*, 2009, vol. 10, pp. 1897–1903.

10. Yang X., Cao W., Zhou J., Zhang W., Zhang X., Lin W., Fei Z., Lin H., Wang B., "l4-3-3 zeta positive expression is associated with a poor prognosis in patients with glioblastoma", *Neurosurgery*, 2011, vol. 68 (4), pp. 932–938.

Информация об авторах

Станишевский Станислав Борисович – магистр хим. наук, мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Stanislau.Stanisheuski@gmail.com.

Иванчик Александр Викторович – аспирант, мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: AlexIvan4ik@gmail.com.

Шапиро Михаил Анатольевич – магистр биол. наук, мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: MShapira2016@gmail.com.

Янцевич Алексей Викторович – канд. хим. наук, зав. лаб., Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Al.Yantsevich@gmail.com.

Сыса Алексей Григорьевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Aliaksei.Sysa@gmail.com.

Information about the autors

Stanislau B. Stanisheuski – M. Sc. (Chemistry), Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Stanislau.Stanisheuski@gmail.com.

Aliaksandr V. Ivanchyk – Ph. D. student, Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: AlexIvan4ik@gmail.com.

Michail A. Shapira – M. Sc. (Biology), Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: MShapira2016@gmail.com.

Aliaksey V. Yantsevich – Ph. D. (Chemistry), Head of Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Al.Yantsevich@gmail.com.

Aliaksei G. Sysa – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Aliaksei.Sysa@gmail.com.

ISSN 1561-8331(print.)

ХІМІЯ ВЫСОКАМАЛЕКУЛЯРНЫХ ЗЛУЧЭННЯЎ

POLYMER CHEMISTRY

УДК: 541(64+14):547.391.1

Поступила в редакцию 20.02.2017
Received 20.02.2017

А. А. Горбачев, Т. М. Шейпак, А. В. Данильчик, Е. В. Луценко, О. Н. Третинников

Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ ПРИВИВОЧНАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКОИНТЕНСИВНОГО УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

Аннотация: Исследована УФ индуцированная прививочная полимеризация акриловой кислоты на поверхности пленок полипропилена под действием высокоинтенсивного (750 мВт/см^2) излучения светодиодов. Время выхода реакции на насыщение составило 30 с, когда при использовании излучения с низкой интенсивностью (10–15 мВт/см^2), характерного для традиционных источников УФ-излучения, время выхода на насыщение составляет десятки минут. Методом ИК-спектроскопии НПВО с использованием элементов внутреннего отражения с различной глубиной проникновения зондирующего излучения ZnSe–45° и Ge–45° было показано, что образование привитого полимера происходит в тонком поверхностном слое без существенного проникновения в объем пленки. Измерения краевого угла смачивания для воды на поверхности модифицированных пленок показали, что минимальный угол смачивания (21°) достигается при невысоких значениях количества привитого полимера.

Ключевые слова: модификация, поверхность, полипропилен, прививка, фотополимеризация

Для цитирования: Фотоиндуцированная прививочная полимеризация на поверхности под действием высокоинтенсивного УФ-излучения / А. А. Горбачев [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 85–89.

A. A. Gorbachev, T. M. Sheipak, A. V. Danilchyk, E. V. Lutsenko, O. N. Tretinnikov

B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

UV-INDUCED GRAFT POLYMERIZATION ON SURFACE UNDER HIGH-POWER UV IRRADIATION AND THE PROPERTIES OF THE SURFACE-GRAFTED POLYMER

Abstract: UV-induced graft polymerization of acrylic acid on the polypropylene film surface under high-power (750 mW/cm^2) irradiation from UV-LEDs was investigated. The maximum amount of grafted polymer was reached in 30 s, while using low-power irradiation (10–15 mW/cm^2) takes tens of minutes for the same amount of product. IR FTIR spectroscopy with different radiation penetration depth reflection elements of ZnSe–45° и Ge–45° showed the grafted polymer to be formed in a thin surface layer without any significant insertion throughout the film. Contact angle for water showed a minimum (21°) at 15 s of UV-irradiation time at small amounts of grafted polymer.

Keywords: polypropylene, photopolymerization, modification, grafting, surface

For citation: Gorbachev A. A., Sheipak T. M., Danilchyk A. V., Lutsenko E. V., Tretinnikov O. N**.** UV-induced graft polymerization on surface under high-power UV irradiation and the properties of the surface-grafted polymer geochemistry. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 85–89 (In Russian).

Введение. Фотоиндуцированная прививочная полимеризация на поверхности – простой, неразрушающий, экономичный и экологически чистый способ прививки функциональных полимеров к поверхности полимерных материалов, получения на этой основе селективных мембран, сорбентов, биосовместимых и биоактивных материалов, микрожидкостных и сенсорных устройств [1]. Для получения поверхностно-привитых полимеров этим способом используют УФ-излучение ртутных ламп на длине волны 365 нм. Из-за относительно низкой интенсивности УФ-излучения (~1–10 мВт/см^2) длительность полимеризации достигает десятков минут, что ограничивает области ее промышленного применения. Недавно с использованием источника на высокомощных УФ светодиодах, дающего излучение на длине волны 365 нм с интенсивностью до 200 мВт/см^2, нами достигнуто сокращение длительности прививочной полимеризации до 1,5–2 мин [2]. Однако этого недостаточно для полноценной реализации процесса в непрерывном рулонном (roll-to-roll) режиме.

В целях дальнейшего сокращения длительности прививочной фотополимеризации на поверхности нами изготовлен светодиодный источник, дающий излучение на длине волны 365 нм с интенсивностью до 800 мВт/см^2, изучена кинетика полимеризации, индуцируемой этим излучением и исследованы характеристики образующегося поверхностно-привитого полимера.

Экспериментальная часть. Двухосно-ориентированную пленку полипропилена (ПП) толщиной 40 мкм производства ОАО «Могилевский завод искусственного волокна» перед применением очищали экстракцией ацетоном в аппарате Сокслета. Акриловая кислота (АК) и бензофенон (БФ) с чистотой не менее 99% были получены от Sigma-Aldrich.

Прививочную полимеризацию проводили по методу «тонкого слоя» [3]. Пленку ПП помещали в 5%-ный раствор БФ в ацетоне на 5 мин, сушили 20 мин на воздухе, укладывали на кварцевую пластину, наносили на поверхность пленки каплю 20%-ного водного раствора АК заданного объема и накрывали второй кварцевой пластиной так, чтобы раствор равномерно распределился по поверхности пленки. При этом толщина слоя раствора мономера составляла 7–10 мкм. Полученную кювету фиксировали по краям металлическими зажимами и помещали под источник УФ-излучения. Температуру в зоне реакции поддерживали равной 35–40 °С. После облучения пленку извлекали из кюветы, промывали в дистиллированной воде и сушили на воздухе.

Светодиодным УФ-источником излучения служил излучатель собственного изготовления, состоящий из шестидесяти светодиодов NC4U133A-E (Nichia, Япония), излучающих на длине волны 365 нм. Максимальная рабочая оптическая мощность одного светодиода – 2 Вт. Излучатель дает равномерную засветку на расстоянии от светодиодов 3 см, при этом площадь засветки равна 150 см^2, максимальная рабочая плотность мощности излучения 800 мВт/см^2.

ИК-спектры поверхности пленок получали методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) с помощью приставки Smart ARK (Thermo Spectra-Tech, США) с элементами внутреннего отражения (ЭВО) из кристаллов ZnSe и Ge с углом отражения 45°. Статические углы смачивания для воды на поверхности пленок измеряли проекционным методом.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены ИК-спектры НПВО, полученные с помощью ЭВО ZnSe–45° и Ge–45° с поверхности исходной пленки ПП и пленок, модифицированных УФ-индуцированной прививочной полимеризацией АК при плотности мощности излучения 750 мВт/см^2 и различных временах УФ-облучения. Спектры нормированы на интенсивность полосы поглощения ПП при 1376 см$^{-1}$. В спектрах модифицированных пленок ПП имеются полосы поглощения при 1710 и 1247 см$^{-1}$, характерные для полиакриловой кислоты (ПАК), что указывает на образование привитого полимера. При увеличении продолжительности облучения интенсивность полос поглощения ПАК по отношению к интенсивности полос ПП возрастает в результате роста количества привитого полимера.

Эффективная глубина проникновения зондирующего излучения в исследуемые пленки для ЭВО ZnSe–45° в 3 раза больше чем для ЭВО Ge–45° (1,2–1,9 и 0,37–0,60 мкм в спектральном диапазоне 1800–1100 см$^{-1}$ соответственно) [4]. Из рассматриваемых спектров следует, что при увеличении глубины зондирования путем замены ЭВО Ge–45° на ЭВО ZnSe–45° относительная интенсивность полосы поглощения привитой ПАК при 1710 см$^{-1}$ значительно уменьшается. Это показывает, что образование привитого полимера происходит в тонком поверхностном слое без существенного проникновения в объем пленки.

На рис. 2 представлены зависимости количества привитой ПАК, образующейся на пленках ПП при плотности мощности УФ-излучения 750 мВт/см^2, и краевого угла смачивания для воды на этих пленках от времени облучения. Количество привитого полимера определяли в относительных единицах из ИК-спектров НПВО, зарегистрированных с помощью ЭВО ZnSe–45°, по формуле

$$G = A_{1710}/(A_{1710} + A_{1376}), \quad (1)$$

где A_{1710} и A_{1376} – интенсивности полосы ПАК при 1710 см$^{-1}$ и полосы ПП при 1376 см$^{-1}$ соответственно. Видно, что количество привитого полимера монотонно увеличивается и уже через 30 с достигает значения 0,65, которое при использовании источников УФ-излучения с меньшей плотностью мощности является максимальным (выход реакции на насыщение) и достигается за время от полутора до десятков минут [2].

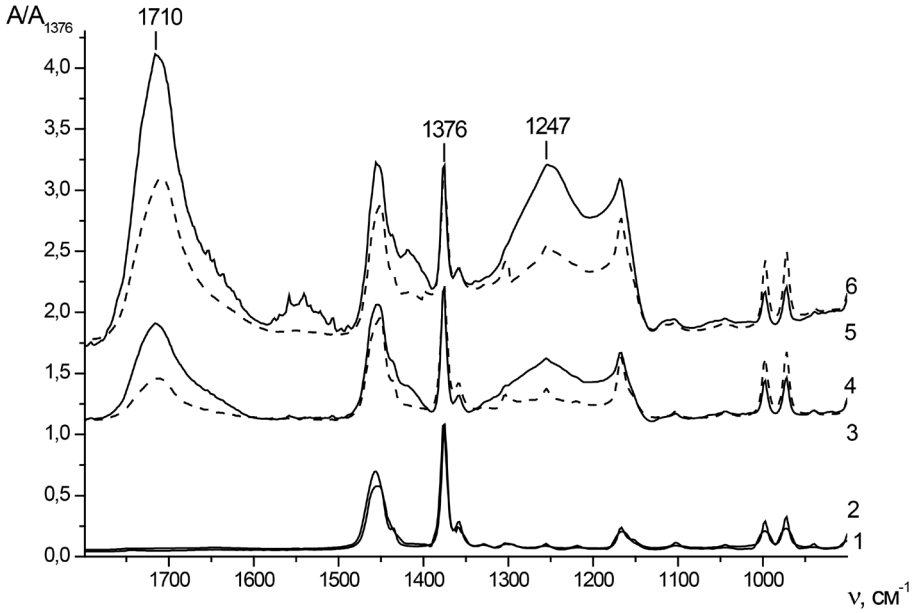


Рис. 1. ИК-спектры НПВО исходных пленок ПП и пленок, модифицированных прививочной фотополимеризацией АК при времени УФ-облучения 10 (*3, 4*) и 25 с (*5, 6*), зарегистрированые с помощью ЭВО ZnSe–45° (*1, 3, 5*) и Ge–45° (*2, 4, 6*)

Fig. 1. FTIR spectra of original PP films and the films modified with AA by UV-induced graft polymerization at irradiation times of 10 s (*3, 4*) and 25 s (*5, 6*) registered with ZnSe–45° (*1, 3, 5*) and Ge–45° (*2, 4, 6*) reflection elements

Угол смачивания для исходной (непривитой) пленки ПП составляет 95°. Через 5 с УФ-облучения угол смачивания снижается до ~60°, так как изначально гидрофобная поверхность пленки ПП покрывается гидрофильными цепями поверхностно-привитой ПАК. При увеличении продолжительности реакции до 15 с угол смачивания снижается до 21°. Это объясняется тем, что при увеличении количества привитого полимера в процессе УФ-облучения поверхность пленки становится еще более гидрофильной. Однако при дальнейшем увеличении продолжи-

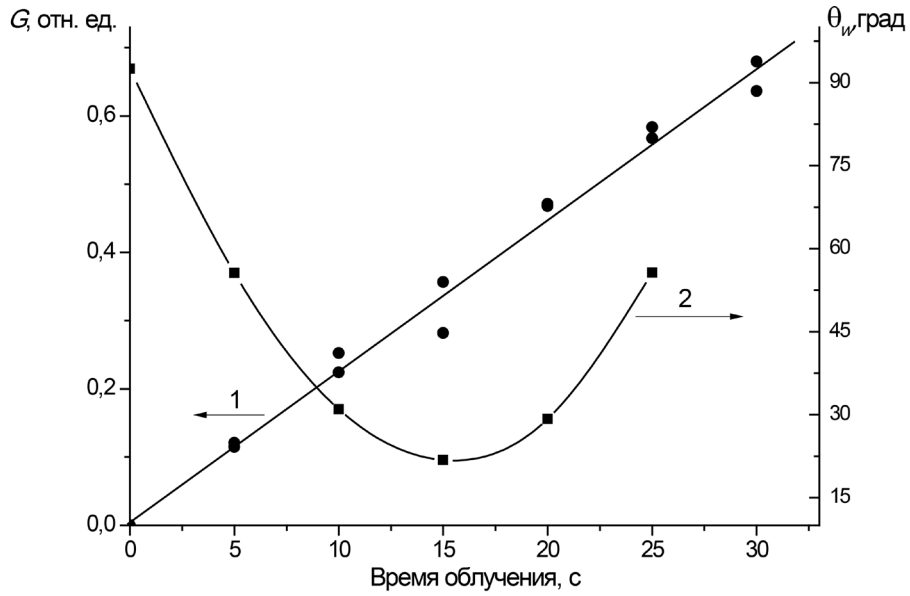


Рис. 2. Зависимости количества привитой ПАК *G* (*1*), образующейся при интенсивности УФ-излучения 750 мВт/см^2, и краевого угла смачивания для воды θ_w (*2*) от времени облучения

Fig. 2. The amount of grafted PAA G (1) formed at UV irradiation intensity of 750 mW/cm^2 and contact angle for water θ_w (*2*) versus irradiation time

тельности УФ-облучения смачивание поверхности водой ухудшается (θ_w увеличивается), несмотря на то что количество прививки продолжает расти. Ухудшение смачивания может быть вызвано тем, что при высоких плотностях прививки усиливаются когезионные взаимодействия в привитом полимере, приводящие к уменьшению его взаимодействия со смачивающей жидкостью [5], или образуются кластеры привитых цепей, из-за чего поверхность становится химически и морфологически гетерогенной [6].

Заключение. С использованием УФ-излучения с плотностью мощности 750 мВт/см^2 осуществлена прививочная фотополимеризация АК на поверхности пленок ПП. Время выхода реакции на насыщение составило 30 с, что в разы меньше, чем при использовании источников с меньшей интенсивностью УФ-излучения. Методом ИК спектроскопии НПВО с использованием элементов внутреннего отражения ZnSe–45° и Ge–45°, дающих различную глубину проникновения зондирующего излучения, установлено, что прививка протекает на поверхности модифицируемой пленки ПП без заметного проникновения в объем. Минимальный угол смачивания для воды на модифицированных пленках составил 21° и был достигнут при времени облучения 15 с, что в 2 раза меньше, чем время выхода реакции на насыщение. При бóльших временах облучения (большей плотности прививки) смачиваемость поверхности водой ухудшается (угол смачивания растет) из-за усиления когезионных взаимодействий между плотно привитыми цепями.

Благодарности. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект X15M-062).

Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This work has been performed with a financial support of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant № X15M-062).

This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations / J. Deng [et al.] // Prog. Polym. Sci. – 2009. – Vol. 34, № 2. – P. 156–193.

2. Фотоиндуцированная прививочная полимеризация на поверхности с использованием излучения высокомощных ультрафиолетовых светодиодов / О. Н. Третинников [и др.] // Высокомол. соед. – 2016. – Т.58, №3. – С. 231–237.

3. Третинников, О. Н. Инициированная бензофеноном прививочная фотополимеризация акриловой кислоты на поверхности полиэтилена из водного раствора мономера без его деаэрации / О. Н. Третинников, В. В. Пилипенко, Л. К. Приходченко // Высокомол. соед. Б. – 2012. – Т. 54, № 9. – С. 1458–1465.

4. Харрик, Н. Спектроскопия внутреннего отражения / Н. Харрик. – М.: Мир, 1970. – 335 с.

5. Tretinnikov, O.N. Hydrogen bonding and wettability of surface-grafted organophosphate polymer / O.N. Tretinnikov, Y. Ikada // Macromolecules. – 1997. – Vol. 30, № 4. – P. 1086–1090.

6. Hydrophilic and adhesive properties of polyethylene plates grafted with hydrophilic monomers / K. Yamada [et al.] // Journal of applied polymer science. – 1992. – Т. 46, №. 6. – С. 1065–1085.

References

1. Deng J., Wang L., Liu L., Yang W., “Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations”, *Progress in Polymer Science*, 2009, vol. 34, no. 2, pp. 156–193.

2. Tretinnikov O. N., Gorbachev A. A., Lutsenko E. V., Danil’’chik A. V., Shkrabatovskaia L. V., Prikhodchenko L. K., “Photoinduced graft polymerization on a surface using radiation from high-power ultraviolet light-emitting diodes”, *Vysokomolekuliarnye soedineniia. Seriia B* [Polymer Science Series B], 2016, vol. 58, no. 3, pp. 231–237.

3. Tretinnikov O. N., Pilipenko V. V., Prikhodchenko L. K., “The grafted photopolymerization of acrylic acid initiated by benzophenone on the surface of polyethylene from an aqueous solution of a monomer without its deaeration”, *Vysokomolekuliarnye soedineniia. Seriia B* [Polymer Science Series B], 2012, vol. 54, no. 9, pp. 1458–1465.

4. Kharrik N., *Spektroskopiia vnutrennego otrazheniia* [Internal reflection spectroscopy], Mir, Moscow, RU, 1970.

5. Tretinnikov O.N., Ikada Y., “Hydrogen bonding and wettability of surface-grafted organophosphate polymer”, *Macromolecules*, 1997, vol. 30, no. 4, pp. 1086–1090.

6. Yamada K., Tsutaya H., Tatekawa S., Hirata M., “Hydrophilic and adhesive properties of polyethylene plates grafted with hydrophilic monomers”, *Journal of applied polymer science*, 1992, vol. 46, no. 6, pp. 1065–1085.

Информация об авторах

Горбачев Александр Александрович – мл. науч. сотрудник, Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (пр. Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.gorbachev@ifanbel.bas-net.by.

Шейпак Татьяна Михайловна – мл. науч. сотрудник, Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (пр. Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatjana-shejjpak@mail.ru.

Данильчик Александр Викторович – науч. сотрудник, Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (пр. Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.danilchyk@ifanbel.bas-net.by.

Луценко Евгений Викторович – канд. физ.-мат. наук, доцент, ведущий науч. сотрудник, Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (пр. Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.lutsenko@ifanbel.bas-net.by.

Третинников Олег Николаевич – д-р физ.-мат. наук, зав. лаб., Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Бе-ларуси (пр. Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: o.tretinnikov@ifanbel.bas-net.by.

Information about the authors

Alexander A. Gorbachev – Junior researcher, B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.gorbachev@ifanbel.bas-net.by.

Tatjana M. Sheipak –Junior researcher, B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatjana-shejjpak@mail.ru.

Alexander V. Danylchyk – Researcher, B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.danilchyk@ifanbel.bas-net.by.

Evgeniy V. Lutsenko – Ph. D. (Physics and Mathematics), Associate Professor, Senior researcher, B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: e.lutsenko@ifanbel.bas-net.by.

Oleg N. Tretinnikov – D. Sc. (Physics and Mathematics), Head of Laboratory, B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: o.tretinnikov@ifanbel.bas-net.by.

ISSN 1561-8331(print.)

ГЕАХІМІЯ
GEOCHEMISTRY

УДК 631.445.15(476.7)

Поступила в редакцию 27.07.2016
Received 27.07.2016

Н. В. Михальчук

Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси, Брест, Беларусь

ПОДВИЖНЫЕ ФОРМЫ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПОЧВАХ КАРБОНАТНОГО РЯДА ЮГО-ЗАПАДА БЕЛАРУСИ

Аннотация: Комплекс геохимических барьеров в почвах карбонатного ряда существенно влияет на накопление и распределение по профилю большинства изученных тяжелых металлов (ТМ) и микроэлементов. В пределах совмещенного щелочного, карбонатного барьера горизонта BS_{Ca} резко ограничивается подвижность таких опасных ТМ, как Pb, Zn, Cd, Ni. В то же время сохраняется миграционная активность и опасность накопления в растениях Cr и отчасти Mn.

Ключевые слова: тяжелые металлы, микроэлементы, подвижные формы, карбонатные почвы, геохимические барьеры, радиальная контрастность

Для цитирования: Михальчук, Н. В. Подвижные формы тяжелых металлов и микроэлементов в почвах карбонатного ряда юго-запада Беларуси / Н. В. Михальчук // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 90–97.

N. V. Mikhalchuk

The Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Brest, Belarus

MOBILE FORMS OF HEAVY METALS AND TRACE ELEMENTS IN CARBONATE RANGE SOILS OF THE SOUTHWEST PART OF BELARUS

Abstract: The complex of geochemical barriers in soils of a carbonate range significantly affects accumulation and profile distribution of the majority of the studied heavy metals and minerals. Within combined alkaline-carbonate barrier of the BS_{Ca} horizon, the migratory mobility of such dangerous heavy metals as Pb, Zn, Cd, Ni is sharply limited. At the same time, migratory activity and danger of accumulation in plants of Cr and partly Mn remains.

Keywords: heavy metals, minerals, mobile forms, carbonate soils, geochemical barriers, radial contrast

For citation: Mikhalchuk N. V. Mobile forms of heavy metals and trace elements in carbonate range soils of the southwest part of Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 90–97 (In Russian).

Введение. В настоящее время тяжелые металлы (ТМ) общепризнанно рассматриваются в качестве приоритетных загрязнителей почв [1, 2]. При этом наиболее активными агентами загрязнения являются их подвижные формы, способные переходить из твердых фаз в почвенные растворы и поглощаться растениями. В этой связи увеличивается интерес к почвенным компонентам и субстратам, которые прочно закрепляют подобные поллютанты, затрудняя их поступление в растения, препятствуя попаданию в грунтовые воды [3]. В почвах широко распространены такие активные компоненты-носители ТМ, как глины, органическое и карбонатное вещества, оксиды и (гидр)оксиды железа и марганца, сульфиды [4]. Указывается [5], что эффективность носителей в большой степени зависит от кислотно-основных и редокс-условий в почвах: прочность закрепления многих катионогенных ТМ возрастает в нейтральной и слабощелочной среде по сравнению с кислой. Учет перечисленных особенностей крайне важен при разработке приемов снижения миграционной активности ТМ в загрязненных почвах. Среди этих приемов к числу

© Михальчук Н. В., 2017

приоритетных ряд исследователей относит применение карбонатосодержащих мелиорантов [6, 7]. Поэтому важно выяснить особенности накопления и перераспределения ТМ в природных (фоновых) почвах, имеющих в своем составе карбонатные образования в виде четко оформленных генетических горизонтов или проявляющих характерную приуроченность к определенным частям профиля. К числу таких почв в условиях Белорусского Полесья относятся прежде всего почвы карбонатного ряда. Исследование накопления и перераспределения ТМ в подобных почвах актуально еще и потому, что они в известной степени могут выступать в качестве естественного природного аналога почвенно-геохимических ситуаций, складывающихся при использовании карбонатосодержащих мелиорантов как почвоулучшающих субстратов на почвах иных категорий.

Объекты и методы исследований. Исследования проведены в природных ландшафтах юго-запада Беларуси, преимущественно в границах физико-географического округа Брестское Полесье. Образцы почв отбирали из поверхностного горизонта почв до глубины 10 см, а также из почвенного разреза по генетическим горизонтам. Почвенные разрезы закладывали в центре ключевой площадки до глубины 1,3–1,5 м, т.е. до уровня почвообразующей породы (горизонт С). Исследованию подвергались дерновые заболоченные карбонатные (ДЗК) песчаные и супесчаные почвы, усредненное содержание $CaCO_3$ в карбонатном горизонте которых составляло 38,6 %, и некоторые категории почв на известковых пресноводных отложениях (ИПО).

В работе рассматривали восемь элементов, которые всегда включаются в группу ТМ: цинк, медь, марганец, свинец, кадмий, никель, кобальт, хром (часть исследуемых элементов – Zn, Cu, Mn, Co входят в группу почвенных микроэлементов). В необходимых случаях исследовали ландшафтно-геохимическое поведение железа. При изучении особенностей вертикальной дифференциации элементов за основу был взят коэффициент радиальной контрастности. Он определялся по формуле $K_к = Z/Z_1$, где Z – содержание элемента в генетическом горизонте почвы, Z_1 – средневзвешенное содержание элемента в почвенной толще [8].

Почву сушили до воздушно-сухого состояния, измельчали до частиц менее 1 мм. Содержание подвижных форм ТМ в воздушно-сухих образцах почв определяли с помощью вытяжек 1 N HCl (отношение почвы к экстрагенту 1:10, для торфяных почв с ИПО – 1:20) атомно-абсорбционным методом на приборе SOLAAR MkII M6 Double Beam AAS.

Результаты исследований и их обсуждение. Согласно [9], при распределении ТМ в почвенном профиле горизонты выступают в качестве многослойного фильтра, а почва рассматривается как система геохимических барьеров.

В табл. 1 приведены усредненные данные, отражающие особенности распределения подвижных форм ТМ и микроэлементов в поверхностном (0–10 см) слое гумусового горизонта A_1 (биогеохимический барьер), в карбонатном горизонте BS_{Ca} (совмещенный испарительный, карбонатный, щелочной барьер), а также в почвообразующей породе С фоновых ДЗК почв.

Таблица 1. **Содержание и коэффициенты вариации подвижных форм тяжелых металлов в основных горизонтах фоновых дерновых заболоченных карбонатных почв**

Table 1. **Content and variation coefficients for mobile forms of heavy metals in main horizons of background soddy swampy carbonate soils**

Горизонт		Zn*	Fe	Cu	Mn	Pb	Cd	Ni	Co	Cr
A_1	1	4,77± 0,34	1581,00± 187,82	1,82± 0,26	269,17± 23,61	5,59± 0,43	0,18± 0,02	2,13± 0,22	1,12± 0,11	1,83± 0,38
	2	38,89	65,07	78,87	48,05	35,05	52,02	47,50	43,69	95,29
B_{Ca}	1	1,12± 0,17	1442,38± 173,73	0,45± 0,07	456,42± 53,24	0,12± 0,08	0,03± 0,02	0,95± 0,25	0,42± 0,08	8,85± 2,31
	2	59,78	48,18	59,22	46,66	180,18	154,93	75,24	53,00	73,79
C	1	0,84± 0,11	96,29± 10,06	0,27± 0,04	3,83± 1,15	0,39± 0,09	0,02± 0,02	0,05± 0,01	0,23± 0,16	0,35± 0,18
	2	55,83	43,08	64,89	123,64	63,22	185,51	66,14	188,15	150,07

Примечание. 1 – среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего; 2 – коэффициент вариации (V), %.
* Количество проанализированных проб: Zn, Fe, Cu, Mn – 30, Pb, Cd, Ni, Co, Cr – 21.

Распределение некоторых химических элементов в пределах почвенного профиля косвенно указывает на их биологическую значимость [1]. В этой связи вполне закономерно, что элементы, которые характеризуются выраженной биофильностью, более интенсивно накапливаются в поверхностных гумусовых горизонтах почвенного профиля. Поэтому содержание Zn и Cu в горизонте A_1 ожидаемо оказалось соответственно в 5,7 и 6,7 раза больше, чем в материнской породе С. Биогенную обусловленность в значительной степени имеет и накопление Mn, достигающее значений 270 мг/кг. Аккумуляция Pb, Cd, Ni, Co также оказалась максимальной в данном слое. При этом накопление Pb и Cd носит, по-видимому, техногенный характер, так как не установлено значение данных элементов в жизнедеятельности биологических систем. Содержание таких рассеянных элементов, как Co и Ni весьма низкое (соответственно 1,12 и 2,13 мг/кг), что в первую очередь определяется крайне низким их содержанием в почвообразующей породе (0,23 и 0,05 мг/кг соответственно). В то же время в литературе имеются указания на известную биофильность данных элементов, что может свидетельствовать об их частичном поступлении в горизонт A_1 биогенным путем [10, 11].

Определяющее влияние на поведение рассматриваемых элементов в профиле почв оказывает карбонатное вещество. Карбонатизация почв прежде всего сильно влияет на состояние высокодисперсных компонентов почвы, с которыми связана значительная часть находящихся в почве рассеянных ТМ. К примеру, в лесных почвах Pb мигрирует в основном в форме, сорбированной дисперсным взвешенным веществом (лессиваж) [12]. Однако под влиянием карбонатообразования создается прочная сильнопористая организация высокодисперсного вещества почвы, а глинистые минералы предохраняются от деструкции, что затрудняет формирование взвесей, переносящих ТМ [13]. Карбонатность рассматриваемых почв начинает возрастать уже в переходном к карбонатному слою BS_{Ca} горизонте $A_1B_{1(Ca)}$, где содержание $CaCO_3$+$CaMg(CO_3)_2$ достигает значений 15–20%, и более, что существенно ограничивает нисходящую миграцию по почвенному профилю большинства изученных ТМ, за исключением Cr и Mn. Поэтому в карбонатном горизонте BS_{Ca} отмечаются достаточно низкие уровни содержания большинства ТМ. Особенно резко (более чем в 46 раз) уменьшается здесь содержание Pb. В меньшей степени снижается концентрирование Cd (в 6 раз), Cu и Zn (в 4,0–4,3 раза), а также Ni и Co (в 2,2–2,7 раза). При этом большинство из перечисленных элементов находятся в карбонатном веществе в прочно сорбированном состоянии. Так, Zn в щелочной среде образует преимущественно малорастворимый цинкат кальция $CaZnO_2$ [14]. Согласно [12], при росте pH прочность соединений ТМ с почвенными компонентами возрастает и в целом выдерживается ряд адсорбции Pb>Cu>Zn>Cd.

В повышенном количестве на карбонатных носителях накапливаются Cr и Mn: усредненное содержание первого элемента в горизонте BS_{Ca} в 4,8 раза выше, чем в горизонте A_1, и в 25,3 раза больше, чем в почвообразующей породе; аккумуляция Mn выглядит еще более асимметричной – в 1,7 и 119,2 раза соответственно.

Минимальные уровни аккумуляции подвижных форм микроэлементов и ТМ отмечаются в почвообразующих породах – специфическая особенность ландшафтов Полесья как результат неоднократной перемытости и переотложенности водно-ледниковых песков. При этом выносились и выщелачивались все подвижные соединения щелочных и щелочноземельных элементов и связанных с ними макро- и микроэлементов, которые в дальнейшем участвовали в формировании химического состава природных вод и осадков. Дефициту элементов способствует также химическая инертность основного почвообразующего минерала – кварца. В результате почвообразующие породы не оказывают заметного влияния на концентрирование и характер распределения элементов в горизонтах BS_{Ca} и A_1.

В отношении варьирования значений содержания ТМ в почвах подтверждается закономерность, отмеченная в [15], когда изменчивость содержания какого-либо компонента почвы возрастает по мере уменьшения количества этого компонента. Особенно это проявляется в группе рассеянных элементов; коэффициент *V* большинства ТМ и микроэлементов ожидаемо достигает максимальных значений в почвообразующей породе.

Среди почв карбонатного ряда в нашем исследовании рассмотрены также почвы, развивающиеся на ИПО или содержащие данные отложения в качестве горизонта-включения. В их числе особую актуальность имеет исследование условий и особенностей накопления и перераспределения ТМ в отложениях лагунообразных фаций, как правило, в соответствующих почвенных разрезах представлены различные типы отложений, в том числе карбонатных. Находясь в подчиненном положении по отношению к сопряженным с ними фациям повышенных участков, они выступают в качестве природного депонента ТМ. Уникальным в этом отношении является разрез Уг6, заложенный в лагунообразном понижении на ключевом участке (КУ) «Уголаз» (модельный полигон (МП) «Днепробуг», Кобринский район). Здесь под торфяной залежью в 0,4 м залегает слой ИПО толщиной 0,1 м, ниже которого располагается органогенно-минеральный горизонт $A_{(Ca)\downarrow f}$, мощностью до 0,13 м. Содержание $CaCO_3$ в слое ИПО составляет 71,6 %; значения pH в KCl изменяются от 6,26 в горизонте Ат до 7,23 в ИПО и 6,95 в горизонте BC.

Строение разреза и особенности распределения микроэлементов представлены на рис. 1 и 2, фактические данные приведены в табл. 2.

Таблица 2. **Содержание подвижных форм химических элементов (1) и коэффициенты их радиальной контрастности $K_к$ (2) в торфяно-глеевой карбонатной почве (разрез Уг6)**

Table 2. **The content of chemical elements' mobile forms (1) and coefficients of their radial contrast $K_к$ (2) in peat-gley carbonate soil (section Ug6)**

Горизонт	Содержание химического элемента, мг/кг																	
	Zn		Cu		Mn		Pb		Cd		Ni		Co		Cr		Fe	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Ат	3,26	0,9	2,16	0,8	77,9	0,4	7,67	3,3	0,27	1,3	0,61	0,5	1,02	1,4	2,46	0,8	3700	1,6
$Ат_z$	9,64	2,7	4,87	1,7	119,9	0,6	5,22	2,2	0,14	0,7	2,84	2,4	1,71	2,3	2,77	0,9	4779	2,1
B_{1Ca} (верхняя часть горизонта)	3,82	1,1	2,45	0,9	468,8	2,1	1,38	0,6	0,09	0,5	0,12	0,1	0,24	0,3	4,98	1,5	1197	0,5
B_{1Ca} (нижняя часть горизонта)	1,63	0,4	0,91	0,3	545,4	2,5	–	0	0,25	1,1	0,11	0,1	0,32	0,4	4,04	1,3	816	0,4
$A_{(Ca)\downarrow f}$	6,35	1,8	6,44	2,3	294,7	1,3	0,26	0,1	0,51	2,3	4,02	3,3	1,42	2,0	5,67	1,8	4133	1,8
B_{2g}	0,59	0,2	2,97	1,0	24,5	0,1	1,55	0,7	0,04	0,2	0,70	0,6	0,21	0,3	2,64	0,8	1037	0,5
B_3C	0,15	0,04	0,17	0,1	1,1	0,01	0,21	0,1	0,22	–	0,07	0,1	0,19	0,3	0,03	0,01	57	0,03
Средневзвешенное содержание в почве, мг/кг																		
	3,63		2,85		218,9		2,33		0,19		1,21		0,73		3,23		2245,6	

В рассматриваемом разрезе ни по одному из элементов не обнаружено равномерно убывающего с глубиной распределения; отчетливо выделяются три геохимических барьера: биогеохимические – верхний $A_т+A_{тz}$ и нижний $A_{(Ca)\downarrow f}$ и разделяющий их совмещенный (карбонатный, щелочной) барьер горизонта $B_{1Ca(f)}$.

К числу элементов, наиболее заметно накапливающихся и активно мигрирующих в пределах торфяного горизонта, относятся прежде всего интенсивно вовлекаемые в биологический круговорот Zn, Cu, Mn. Так, аккумуляция Cu и Zn в самом верхнем слое приближается к средневзвешенному их содержанию в почве, увеличиваясь у основания торфяного горизонта в 2,3 и 3,0 раза соответственно; коэффициент контрастности $K_к$ возрастает при этом до значений 1,7 и 2,7. Сходную динамику демонстрируют также такие рассеянные элементы, как Ni и Co, в отношении которых существуют разные оценки их биофильности. Помимо явлений выщелачивания, нарастание концентрации данных элементов, а также Cu и Zn к нижней части торфяного горизонта может быть связано с увеличением pH среды, а также со специфической сорбцией соединениями железа, содержание которых здесь максимально. О справедливости подобного утверждения свидетельствует аналогичный характер распределения указанных элементов (особенно Cu и Ni) в профиле почвы лагунообразного понижения КУ «Высокое» (МП «Луково», Малоритский район) (табл. 3).

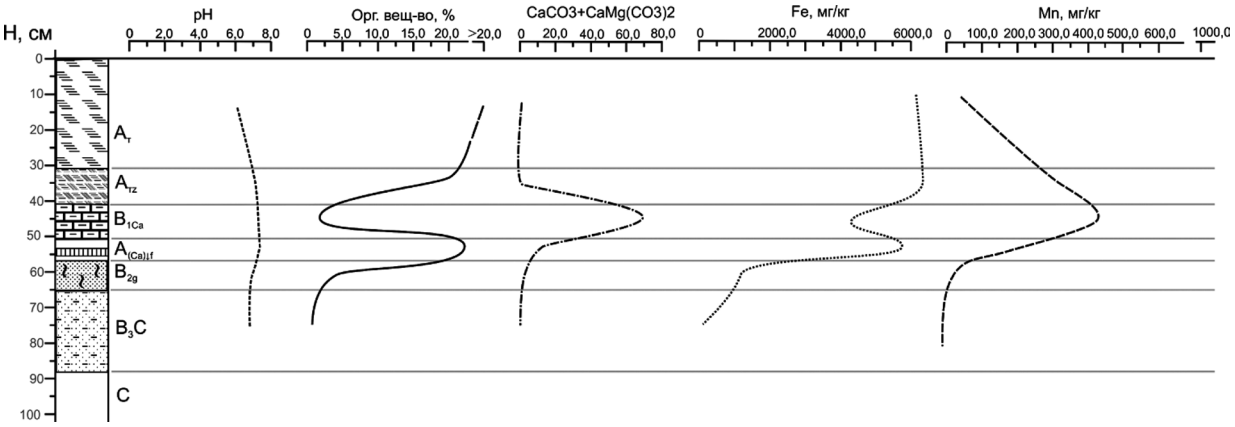


Рис. 1. Радиальное распределение карбонатов и некоторых агро- и геохимических показателей в торфяно-глеевой карбонатной почве (разрез Уг6)

Fig. 1. Radial distribution of carbonates and some agro- and geochemical indicators in peat-gley carbonate soil (section Ug6)

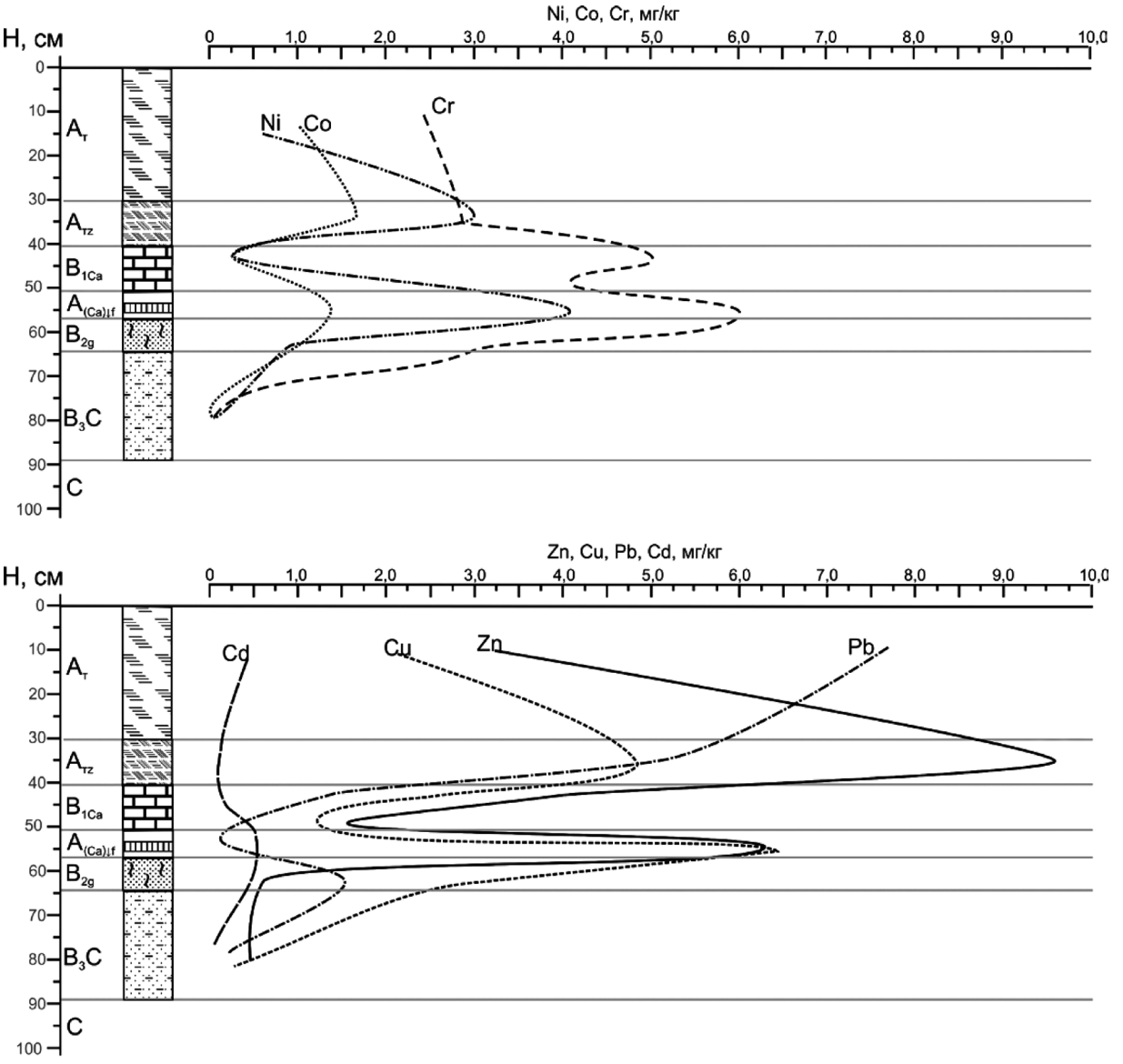


Рис. 2. Радиальное распределение ТМ и микроэлементов в торфяно-глеевой карбонатной почве (разрез Уг6)

Fig. 2. Radial distribution of heavy metals and trace elements in peat-gley carbonate soil (section Ug6)

Таблица 3. **Содержание подвижных форм химических элементов (1) и коэффициенты их радиальной контрастности $K_к$ (2) в торфяно-глеевой низинного типа на известковых пресноводных отложениях почве (разрез Выс Лаг)**

Table 3. **The content of chemical elements' mobile forms (1) and coefficients of their radial contrast *K*к (2) in peat-gley low-lying type on calcareous freshwater sediment soil (Vys Lag section)**

Горизонт	Содержание химического элемента, мг/кг																	
	Zn		Cu		Mn		Pb		Cd		Ni		Co		Cr		Fe	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
At_1	43,77	4,6	4,33	0,7	170	0,8	35,75	4,4	1,32	4,6	2,44	0,6	4,29	2,2	9,38	0,6	6804	1,1
At_2	4,04	0,4	24,77	4,1	108	0,5	10,07	1,2	0,17	0,6	19,05	4,5	3,65	1,9	16,83	1,0	14872	2,3
$At_{z(Ca)}$	4,05	0,4	2,64	0,4	403	1,9	0,07	0,01	0,13	0,5	1,19	0,3	1,05	0,5	30,13	1,8	5615	0,9
B_{1Ca} (верхняя часть горизонта)	2,16	0,2	2,44	0,4	403	1,9	0,94	0,1	0,10	0,3	1,19	0,3	0,8	0,4	30,89	1,8	6554	1,0
B_{1Ca} (нижняя часть горизонта)	1,86	0,2	1,92	0,3	205	1,0	1,50	0,2	0,0	–	1,25	0,3	1,72	0,9	15,23	0,9	4446	0,7
$B_3C_{(f)}$	0,95	0,1	0,31	0,1	5,0	0,02	0,39	0,05	0,0	–	0,06	0,01	0,23	0,1	0,35	0,02	106	0,02
Средневзвешенное содержание в почве, мг/кг																		
	9,47		6,07		215,7		8,12		0,29		4,20		1,96		17,14		6399,5	

На совмещенном геохимическом барьере в карбонатном горизонте BS_{Ca} наиболее интенсивно происходит накопление Cr и особенно Mn. По сравнению с торфяным горизонтом содержание Cr в среднем здесь увеличивается в 1,7 раза и колеблется в абсолютных значениях от 4,04 до 4,98 мг/кг ($K_к$ – от 1,3 до 1,5). Еще более значительным является накопление данного элемента в карбонатном горизонте почв КУ «Высокое»: в почвах ступени А – до 23,0 мг/кг, ступени D (лагуна) – около 31,0 мг/кг при $K_к$ – 1,3–1,4 и 1,8 соответственно. Повышенное накопление Cr в карбонатном горизонте почв отмечается многими исследователями [8, 16] и, судя по константности этого явления во всех изученных нами почвах карбонатного ряда, выступает в качестве общей закономерности. По-видимому, в карбонатной среде сохраняется не только радиальная, но и латеральная подвижность Cr: в отношении данного элемента почвы супераквальных ландшафтов лагунообразных понижений в своем естественном состоянии выступали аккумуляторами данного элемента, поступавшего в том числе из сопряженных с ними ландшафтов повышений.

Еще более контрастным является накопление на совмещенном геохимическом барьере Mn: в профиле разреза Уг6 его $K_к$ достигает значений 2,5; в остальных рассматриваемых случаях, включая почвы КУ «Высокое», колеблется в пределах 1,9–2,0. Однако, несмотря на определенную схожесть поведения Cr и Mn на карбонатных носителях, их способность к транслокациям в растения несколько различается: как показали наши исследования, она сохраняется у Cr и является ограниченной у Mn. По-видимому, в щелочной среде на фоне высокого содержания подвижного Mn снижается доступность растениям его обменных форм.

Миграционная активность всех остальных элементов в пределах карбонатного горизонта резко ограничена; здесь они находятся в прочно сорбированной форме – Pb, Cd и Ni фиксируются или в следовых количествах, их $K_к$ составляет 0,1–0,5. Примерно такие же особенности характерны в поведении на данном барьере таких биофильных элементов, как Cu и Zn: в верхней части карбонатного горизонта их $K_к$ составляет 0,9 и 1,1 соответственно, резко снижаясь в основании слоя до 0,3–0,4. Все эти данные позволяют утверждать, что в отношении Cu и Zn также осуществляется эффективная сорбция карбонатами.

Особый интерес в разрезе Уг6 представляет поведение рассматриваемых элементов на втором биогеохимическом барьере, расположенном под карбонатными отложениями. При этом необходимо специально отметить, что рассматриваемый тип карбонатных отложений по своему генезису не относится к числу эпигенетических (вторичных или наложенных) образований по отношению к почвенной толще. Это сингенетические карбонаты седиментационного генезиса, отложение которых на поверхности ранее сформировавшейся почвы не оказало деформирующего воздействия на ее геохимический режим (или подобное влияние было минимальным). В силу

высокой сорбционной способности в отношении большинства элементов карбонатный горизонт ограничивал их нисходящее перемещение и дополнительное поступление к рассматриваемому барьеру (за исключением, по-видимому, Mn и Cr). Следовательно, содержание большинства химических элементов в горизонте $A_{(Ca)\downarrow f}$ можно в известной степени рассматривать в качестве нативных величин, отражающих геохимическую палеообстановку, сложившуюся в период формирования соответствующего горизонта (по результатам спорово-пыльцевого анализа, выполненного Е. Н. Дрозд, он маркирует SA_1 этап голоцена).

Наиболее контрастно на данном барьере аккумулируются Ni ($K_к$ 3,3), Cu и Cd ($K_к$ 2,3), Co ($K_к$ 2,0); менее интенсивно накапливаются Zn, Cr и Fe ($K_к$ 1,8), а также Mn ($K_к$ 1,3). При этом ряд элементов содержатся в концентрациях, являющихся максимальными в ряду рассматриваемых генетических горизонтов данного разреза: Cu – 6,44 мг/кг, Ni – 4,02, Cd – 0,51, Cr – 5,67 мг/кг. По сравнению с верхним торфяным горизонтом выделяется также своим накоплением Mn – здесь его в 3,0 раза больше по сравнению с усредненным содержанием в $A_т$ и $A_{тZ}$. Учитывая, что подвижность Mn, а также Cr сохраняется в карбонатных отложениях, можно ожидать привноса этих элементов в слой $A_{(Ca)\downarrow f}$ из вышерасположенного карбонатного горизонта. В отношении остальных элементов такое перемещение имело крайне ограниченный характер и уровни их накопления адекватны ландшафтно-геохимической обстановке соответствующих палеопериодов.

Самым низким содержанием на данном барьере отличается свинец – 0,26 мг/кг ($K_к$ 0,1), что в 20–30 раз меньше, чем в двух верхних генетических горизонтах разреза и сопоставимо с содержанием данного элемента в слое BC (0,21 мг/кг) и существенно ниже среднефоновых величин, установленных нами для ДЗК почв (5,59±0,43 мг/кг). Даже если предположить вынос определенного количества свинца в нижележащий горизонт B_g, где его концентрация возрастает до 1,55 мг/кг, это все равно в 4,2 раза ниже, чем усредненное его содержание в верхнем торфяном слое. При этом необходимо отметить, что выщелачивания остальных элементов (за исключением, по-видимому, Cu и Cr) в слой B_g не наблюдалось, а их $K_к$ колеблются здесь от 0,1 до 0,6. Представляется, что миграция свинца в водорастворимой форме в границах слоя $A_{(Ca)\downarrow f}+B_{2g}$ и вынос за его пределы также были незначительными. Так, согласно данным [17], даже при высокой степени загрязнения торфяных почв обнаруживалось ничтожно малое количество водорастворимого свинца.

Выводы. Таким образом, комплекс геохимических барьеров в почвах карбонатного ряда довольно существенно влияет на накопление и распределение по профилю большинства изученных ТМ и микроэлементов. В пределах карбонатного геохимического барьера резко ограничивается миграционная подвижность таких опасных ТМ, как Pb, Zn, Cd, Ni. В то же время сохраняется миграционная активность и опасность накопления в растениях Cr и отчасти Mn. Выявленные особенности имеют принципиальное значение для разработки комплекса мероприятий по регулированию миграционной активности ТМ в агроэкосистемах и предотвращению их транслокаций в сельскохозяйственные растения. Установленные уровни содержания ТМ и микроэлементов в природных ДЗК почвах могут использоваться в качестве субрегиональных фоновых значений в процессе проведения оценок степени загрязнения почв в зонах техногенных воздействий.

Список использованных источников

1. Алексеев, Ю. В. Тяжелые металлы в почвах и растениях / Ю. В. Алексеев. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 142 с.

2. Ильин, В. Б. Тяжелые металлы в системе почва–растение / В. Б. Ильин. – Новосибирск: Наука, 1991. – 150 с.

3. Ладонин, Д. В. Соединения тяжелых металлов в почвах – проблемы и методы изучения / Д. В. Ладонин // Почвоведение. – 2002. – № 6. – С. 682–692.

4. Водяницкий, Ю. Н. Сродство тяжелых металлов и металлоидов к фазам-носителям в почвах (литературный обзор) / Ю. Н. Водяницкий // Агрохимия. – 2008. – № 8. – С. 87–94.

5. Водяницкий, Ю. Н. Природные и техногенные соединения тяжелых металлов в почвах / Ю. Н. Водяницкий // Почвоведение. – 2014. – № 4. – С. 1–13.

6. Клебанович, Н. В. Известкование почв Беларуси / Н. В. Клебанович, Г. В. Василюк. – Минск: БГУ, 2003. – 321 с.

7 Лысухо, Н.А. Отходы производства и потребления, их влияние на природную среду / Н. А. Лысухо, Д. М. Ерошина. Минск : МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2011. – 210 с.

8. Рябова, Л. Н. Геохимическая характеристика почвенного покрова в долине р. Днепр / Л. Н. Рябова // Вес. Нац. акад. навук НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2005. – № 4. – С. 69–75.

9. Глазовская, М. А. Методология эколого-геохимической оценки устойчивости почв как компонента ландшафта / М. А. Глазовская // Изв. РАН. Сер. геогр. – 1997. – № 3. – С. 18–30.

10. Кашин, В. К. Никель в почвах Забайкалья / В. К. Кашин, Г. М. Иванов // Почвоведение. – 1995. – № 10. – С. 1291–1298.

11. Сосорова, С. Б. Кобальт в почвах и растениях дельты р. Селенга / С.Б. Сосорова // Почвоведение. – 2009. – № 7. – С. 806–813.

12. Агроэкология техногенно-загрязненных ландшафтов / Ю. А. Мажайский [и др.]. – Смоленск : Маджента, 2003. – 384 с.

13. Добровольский, В. В. Внутрипочвенное карбонатообразование, высокодисперсное вещество почв и геохимия тяжелых металлов / В. В. Добровольский // Почвоведение. – 2001. – № 12. – С. 1434–1442.

14. Мокриевич, Г. Л. Цинковые удобрения / Г. Л. Мокриевич, З. И. Шлавицкая. Алма–Ата : Кайнар, 1972. – 140 с.

15. Вальков, В. Ф. Оценка и некоторые особенности варьирования генетических характеристик почв / В. Ф. Вальков, Г. Г. Клименко, В. И. Продан // Почвоведение. – 1975. – № 11. – С. 5–13.

16. Кашин, В.К. Хром в почвах Забайкалья / В.К. Кашин, Г.М. Иванов // Почвоведение. – 2002. – № 3. – С. 311–318.

17. Головатый, С. Е. Содержание миграционно-активных форм свинца в дерново-подзолистых и торфяных почвах / С. Е. Головатый, Н. К. Лукашенко, З. С. Ковалевич // Экологический вестник. – 2010. – № 3 (13). – С. 15–22.

References

1. Alekseev Iu. V., Tiazhelye metally v pochvakh i rasteniiakh [Heavy metals in soils and plants], Agropromizdat, Leningrad, RU, 1987.

2. Il'in V. B., Tiazhelye metally v sisteme pochva-rastenie [Heavy metals in soil-plant system], Nauka. Sibirskoe otdelenie, Novosibirsk, RU, 1991.

3. Ladonin D. V., "Compounds of heavy metals in soils – problems and methods of study", Pochvovedenie [Soil Science], 2002, no. 6, pp. 682–692.

4. Vodianitskii Iu. N., "Affinity of heavy metals and metaloids for carrier phases in soils (a review)", Agrokhimiia [Agricultural Chemistry], 2008, no. 8, pp. 87–94.

5. Vodianitskii Iu. N., "Natural and man-caused heavy metal compounds in soils", Pochvovedenie [Soil Science], 2014, no. 4, pp. 1–13.

6. Klebanovich N. V., Vasiliuk G. V., Izvestkovanije pochv Belarusi [Ziming of soils of Belarus], BSU, Minsk, 2003.

7. Lysukho N. A., Eroshina D. M., Otkhody proizvodstva i potrebleniia, ikh vliianie na prirodnuiu sredu [Production and consumption waste; its effect upon the environment], MGEU im. A. D. Sakharova, Minsk, BY, 2011.

8. Riabova L. N., "Geochemical characteristics of soils in Dnepr valley", Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2005, no. 4, pp. 69–75.

9. Glazovskaia M. A., "Methodology of enviromental and geochemical evaluation of the sustainability of soils as landscape component", Izvestiia RAN. Seriia geograficheskaia [Proceedings of Russian Academy of Sciences. Geography Series], 1997, no. 3, pp. 18–30.

10. Kashin V. K., Ivanov G. M., "Nickel in Transbaikal soils", Pochvovedenie [Soil Science], 1995, no. 10, pp. 1291–1298.

11. Sosorova S. B., "Cobalt in soils and plants of Selenga river delta", Pochvovedenie [Soil Science], 2009, no. 7, pp. 806–813.

12. Mazhaiskii Iu. A., Tobratov S. A., Dubenok N. N., Pozhogin Iu. P., Agroekologiia tekhnogenno zagriaznennykh landshaftov [Agroecology of man-polluted lanscapes], Madzhenta, Smolensk, RU, 2003.

13. Dobrovol'skii V. V., "Intrasoil carbonate formation, highy disperse soil substance and geochemistry of heavy metals", Pochvovedenie [Soil Science], 2001, no. 12, pp. 1434–1442.

14. Mokrievich G. L., Shlavitskaia Z. I., Tsinkovye udobreniia [Zinc fertilizers], Kainar, Alma-Ata, KZ, 1972.

15. Val'kov V. F., Klimenko G. G., Prodan V. I., "Evaluation and some features of genetic soil characteristic variation", Pochvovedenie [Soil Science], 1975, no. 11, pp. 5–13.

16. Kashin V. K., Ivanov G. M., "Chromium in Transbaikal soils", Pochvovedenie [Soil Science], 2002, no. 3, pp. 311–318.

17. Golovatyi S. E., Lukashenko N. K., Kovalevich Z. S., "Content of migratory-active forms of lead in sod-podzolic and peat soils", Ekologicheskii vestnik [Environmental Bulletin], 2010, no. 3 (13), pp. 15–22.

Информация об авторах

Михальчук Николай Васильевич – канд. биол. наук, доцент, директор, Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси (ул. Московская, 204/1-1, 224020, Брест, Республика Беларусь). E-mail: dpp@tut.by.

Information about the authors

Mikalai V. Mikhalchuk – Ph. D. (Biology) Associate Professor, Director, Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (204/1-1, Moskovskaya Str., 224020, Brest, Republic of Belarus). E-mail: dpp@tut.by.

ISSN 1561-8331(print.)

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGENEERING

УДК 631.83

Поступила в редакцию 01.11.2016
Received 01.11.2016

И. И. Гончарик, В. В. Шевчук, О. А. Кудина, Ф. Ф. Можейко

Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ СУЛЬФАТА КАЛИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ ХЛОРИДА КАЛИЯ И СУЛЬФАТА КАЛЬЦИЯ

Аннотация: В результате исследований установлено, что присутствие при конверсии хлорида калия и сульфата кальция триэтаноламина способствует образованию сульфата калия по реакции:

$$2KCl + CaSO_4 \cdot 2H_2O \rightarrow K_2SO_4 + CaCl_2 + 2H_2O, \quad (1)$$

тогда как в водной среде этот процесс осуществляется в две стадии: с образованием на первой сингенита и разложением $K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O$ на второй стадии до сульфата калия по схеме:

$$2KCl + 2CaSO_4 \cdot 2H_2O \rightarrow K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O + CaCl_2 + H_2O, \quad (2)$$

$$K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O \rightarrow K_2SO_4 + CaSO_4 + H_2O. \quad (3)$$

Определены оптимальные условия проведения реакции (1) в присутствии триэтаноламина. Для успешного осуществления данного процесса необходимо использовать 60%-ную концентрацию триэтаноламина при норме расхода KCl 140–160% от стехиометрии в течение 3 ч перемешивания и частоте вращения мешалки 350 об/мин. При выполнении этих условий содержание K_2SO_4 в готовом продукте составляет 91–93%, а степень использования иона калия – 90–92%.

Ключевые слова: конверсия, фосфогипс, хлорид калия, температура, время перемешивания

Для цитирования: Получение сульфата калия взаимодействием хлорида калия и сульфата кальция / И. И. Гончарик [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 98–103.

I. I. Goncharik, V. V. Shauchuk, O. A. Kudzina, F. F. Mozheyko

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

PREPARATION OF POTASSIUM SULFATE IN A REACTION OF POTASSIUM CHLORIDE AND CALCIUM SULFATE

Abstract: The introduction of triethanolamine into conversion of potassium chloride and calcium sulfate was found to promote the formation of potassium sulfate on a reaction:

$$2KCl + CaSO_4 \cdot 2H_2O \rightarrow K_2SO_4 + CaCl_2 + 2H_2O, \quad (1)$$

while in a water media this process consists of two stages. On the first stage syngenite is formed, while on the second stage $K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O$ is decomposed with a formation of potassium sulfate as follows:

$$2KCl + 2CaSO_4 \cdot 2H_2O \rightarrow K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O + CaCl_2 + H_2O, \quad (2)$$

$$K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O \rightarrow K_2SO_4 + CaSO_4 + H_2O. \quad (3)$$

The optimal conditions of realization of reaction (1) in presence a triethanolamine are found. For this process to be fulfilled, the 60% concentration of triethanolamine is necessary, with the norm of KCl flow of 140-160% from stoichiometry and a 3 h of agitation at the rotation speed of 350 turns/min. At these conditions the content of K_2SO_4 in the prepared product is 91–93 % and the utilization factor of potassium ion is 90–92%.

Keywords: conversion, phosphogypsum, potassium chloride, temperature, rotation speed of the agitator

For citation: Goncharik I. I., Shauchuk V. V., Kudzina O. A., Mozheyko F. F. Preparation of potassium sulfate in a reaction of potassium chloride and calcium sulfate. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 98–103 (In Russian).

Введение. В калийной промышленности актуальной задачей является значительное увеличение производства бесхлорных калийных удобрений. В настоящее время в ассортименте калийных удобрений около 90% приходится на хлорид калия. Однако из-за содержащегося в нем хлора, хлорид калия далеко не универсальное удобрение. Внесение его под ряд сельскохозяй-

ственных культур ограничено, а в некоторых случаях недопустимо. К таким культурам относятся картофель, табак, виноград, цитрусовые, некоторые овощи, цветы и др.

Для хлорофобных культур наилучшими калийными удобрениями являются сульфат и нитрат калия. При сравнении действия различных форм удобрений под растения на разных почвах установлено, что в каждом случае сульфатные удобрения (K_2SO_4) обладают преимуществами, которые заключаются в том, что они содержат серу в виде сульфат-иона, являющимся незаменимым питательным элементом для развития растений.

Вопросы получения бесхлорных калийных удобрений в последние годы находятся в центре внимания специалистов как в СНГ, так и в развитых зарубежных странах. В настоящее время их производят или планируют к производству все государства, выпускающие калийные удобрения, а также Япония и Бельгия, не имеющие собственного калийного сырья. При существующих масштабах производства и потребления бесхлорных калийных удобрений наблюдается их дефицит. Это свидетельствует о необходимости дальнейшего развития производства бесхлорных форм калийных удобрений. В последние годы особое внимание уделено изучению конверсионных методов производства сульфата калия, основанных на взаимодействии хлорида калия и различных видов сульфатсодержащего сырья по реакции:

$$KCl + MeSO_4 \rightarrow K_2SO_4 + MeCl_n, \quad (1)$$

где Me – Na^+, NH_4^-, H^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} и др.

Из указанных сульфатсодержащих солей в качестве сырья наибольший интерес представляет гипс – $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, который является самым распространенным минералом из группы сульфатов, а также многотоннажным отходом в виде фосфогипса при производстве фосфорных удобрений.

Основой представленного выше процесса является растворимость солей в системе K^+, $Ca^{2+} // Cl^-$, SO_4^{2+} – H_2O. Составные части указанной системы изучены достаточно хорошо в широком интервале температур [1, 2]. Показано, что поле кристаллизации сульфата калия значительно меньше, чем поле кристаллизации сингенита ($K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O$), поэтому гипс на сульфат калия в водной среде можно переработать в две стадии: с образованием на первой стадии сингенита и разложением последнего на второй – до сульфата калия по схеме:

$$2CaSO_4 + 2KCl + H_2O \rightarrow K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O + CaCl_2, \quad (2)$$

$$K_2SO_4 \cdot CaSO_4 \cdot H_2O + H_2O \rightarrow K_2SO_4 + CaSO_4 \cdot 2H_2O. \quad (3)$$

Однако в водном растворе образование сингенита происходит крайне медленно, что выражается в низком выходе сульфата калия в готовый продукт. Поэтому в целях увеличения выхода K_2SO_4 в конечный продукт многие исследователи предлагают проводить данную реакцию в органических растворителях (ацетон, изопропиловый спирт и др.) или азотсодержащих веществ типа аминированных спиртов, в присутствии которых взаимодействие исследуемых солей происходит с образованием K_2SO_4 с исключением промежуточной стадии получения сингенита по реакции:

$$2KCl + CaSO_4 \cdot 2H_2O \rightarrow K_2SO_4 + CaCl_2 + 2H_2O. \quad (4)$$

Образование K_2SO_4 объясняется тем, что органические добавки заметно снижают его растворимость в воде, в результате чего происходит его высаливание в твердую фазу, тем самым сдвигая реакцию (4) в правую сторону.

В настоящее время продолжаются поиски новых органических веществ для получения сульфата калия или сингенита путем прямой конверсии хлорида калия и фосфогипса. С этой целью нами предложено проводить конверсию этих солей в присутствии триэтаноламина (ТЭА). Более подробно в работе [3] этот процесс исследован в присутствии моноэтаноламина, где представлены результаты по растворимости солей K^+, $Ca^{2+} // Cl^-$, SO_4^{2+} – 70%-ный МЭА. Установлено, что поле кристаллизации K_2SO_4 занимает наибольшую площадь диаграммы, которое значительно больше аналогичного поля в водной среде, что свидетельствует о благоприятных условиях кристаллизации сульфата калия в присутствии МЭА. Однако данные исследования были проведены с использованием гипса реактивной квалификации. Предложено также проводить конверсию

этих солей в растворе мочевины [4] или же в водно-аммиачном растворе [5]; изучено влияние гликолей (этиленгликоль или же диэтиленгликоль) на этот процесс [6]. Практически нет исследований с использованием в качестве сульфатсодержащего сырья фосфогипса, являющегося отходом производства фосфорной кислоты. Однако установлено, что чистота получаемого продукта в этом случае будет ниже по сравнению с аналогичным продуктом реактивной квалификации.

Цель настоящей работы – изучение конверсии фосфогипса, полученного в виде отхода при производстве фосфорной кислоты, хлоридом калия в присутствии триэтаноламина.

Методика эксперимента. Для исследований использовали фосфогипс в пересчете на сухое вещество следующего состава (мас.%): CaO – 39,6, SO_3 – 58,9, P_2O_5 – 0,5, F_2 – 0,5, SiO_2~0,2, влажность – 32–38%. Перед осуществлением конверсии фосфогипс предварительно высушивали на воздухе до влажности 19% и измельчали до однородной массы. Исследования проводили следующим образом. К фосфогипсу и KCl добавляли ТЭА и воду в определенном количестве. После интенсивного перемешивания суспензию фильтровали, а затем исследовали составы твердой и жидкой фаз на ионы K^+, Ca^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-} по известным методикам. Ионы K^+ определяли пламенно-фотометрическим методом, Ca^{2+} – комплексонометрическим титрованием трилоном Б, Cl^- – методом прямого титрования раствором $AgNO_3$ в присутствии K_2CrO_4, SO_4^{2-} – гравиметрическим методом. Составы твердой фазы также контролировали рентгенографическими исследованиями. Степень использования иона калия подсчитывали как отношение количества иона калия в готовом продукте к содержанию иона калия, взятого на конверсию.

Результаты исследований и их обсуждение. На процесс конверсии влияет ряд факторов: температура, время и частота перемешивания, концентрация органического растворителя, соотношение исходных компонентов. С целью выбора оптимальных условий ведения данного процесса изучали влияние указанных технологических параметров на получение продукта высокого качества и степени конверсии.

Проведенными опытами по конверсии исходных компонентов в водной среде (табл. 1) установлено, что при температуре 20 ºС и стехиометрической норме KCl этот процесс идет с образованием сингенита и его содержание в твердой фазе составило 56,6 %. При повышении нормы расхода KCl до 160 % наблюдается некоторое увеличение этого показателя до 67,9 %. Как известно, повышение температуры при прочих равных условиях ускоряет химический процесс и понижает вязкость среды, что должно приводить к ускорению столкновения молекул реагирующих веществ. Однако полученные данные свидетельствуют о том, что повышение температуры отрицательно влияет на реакцию обмена между KCl и $CaSO_4$. При температуре 50 °С этот процесс замедляется, и содержание сингенита в осадке падает до 15,9 и 28,0 % при норме расхода KCl 100 и 160 % соответственно. Это согласуется с ранее проведенными исследованиями [2], установившими, что в системе K^+, Ca^{2+}//Cl^-, SO_4^{2-} – H_2O при 50 °С поле сингенита по сравнению с другими полями кристаллизации уменьшается, а следовательно, увеличивается его растворимость. Растворимость же ангидрита с увеличением температуры снижается, что и приводит к ослаблению данного процесса. Таким образом, все последующие опыты проводили при температуре 20 °С.

Таблица 1. **Влияние температуры и нормы расхода KCl от стехиометрии на качественно-количественные показатели процесса конверсии KCl и фосфогипса в водной среде**

Table 1. **The influence of the temperature and KCl flow norm onto qualitative and quantitative characteristics of KCl and phosphogypsum conversion process in a water media**

Норма расхода KCl, %	Температура, ºС	Солевой состав жидкой фазы, мас. %			Солевой состав твердой фазы, мас. %		
		KCl	$CaCl_2$	$CaSO_4$	KCl	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	сингенит
100	20	21,2	3,2	0,2	–	43,4	56,6
100	50	22,0	1,6	0,2	0,3	83,8	15,9
160	20	20,8	3,4	0,2	0,3	31,4	67,9
160	50	21,2	1,9	0,2	2,5	69,5	28,0

Для установления оптимальных условий разложения фосфогипса хлоридом калия в присутствии ТЭА в первой серии опытов было исследовано влияние интенсивности и времени перемешивания на степень разложения солей. Полученные результаты представлены в табл. 2. Исследования проводили при избытке KCl – 160 % от стехиометрической нормы, концентрации ТЭА – 60 %. Как видно из представленных данных, скорость велика и уже в течение получаса даже при интенсивности перемешивания, равной только 100 об·мин$^{-1}$, степень конверсии достигает 72,0 %, а при 450 об·мин$^{-1}$ – 88,1 %. При дальнейшем увеличении времени перемешивания процесс разложения фосфогипса хлористым калием замедляется и уже при 3-часовом взаимодействии при оборотах мешалки 100 и 350 об·мин$^{-1}$, степень конверсии достигает 78,3 и 91,7 %, т. е. повышается на 5,3 и 3,6 % соответственно. Следует отметить, что увеличение частоты вращения мешалки оказывает значительно большее влияние, чем время перемешивания. Так, если при одном и том же времени перемешивания повышение частоты вращения мешалки приводит к увеличению извлечения ионов калия в готовый продукт на 12–16 %, то при изменении времени перемешивания при постоянной частоте вращения мешалки – только на 4–8 %. При недостаточно интенсивном перемешивании твердая фаза, попадая в малоподвижную зону, образует комочки, которые смачиваются только с поверхности. Это снижает степень конверсии и ведет к торможению реакции.

Таблица 2. **Влияние времени перемешивания и скорости вращения мешалки на степень извлечения иона калия в готовый продукт (избыток KCl 60 % от нормы, концентрация ТЭА – 60 %)**

Table 2. **The influence of agitation time and agitator rotation speed on the recovery degree of potassium ion to the final product (KCl taken with 60% norm excess, TEA concentration is 60%)**

Время, мин	Степень конверсии (%) KCl гипсом в зависимости от скорости вращения мешалки, об·мин$^{-1}$			
	100	200	350	450
30	72,0	86,7	87,8	88,1
60	75,0	87,3	88,2	88,3
90	76,3	88,4	88,7	89,0
180	78,3	89,3	91,7	91,8
200	79,4	89,7	92,0	92,1
300	80,3	90,1	92,1	92,2

Определена оптимальная концентрации ТЭА и нормы расхода KCl от стехиометрии согласно реакции № 3 для получения готового продукта высокого качества и выхода. Следует отметить, что при введении в этот процесс триэтаноламина данная реакция идет с получением сульфата калия, что было подтверждено как химическим, так и рентгенографическим методами. Влияние концентрации ТЭА на степень конверсии фосфогипса хлористым калием при различных расходах последнего в реакционной пульпе изучали при следующих условиях: температура – 20 ºС, частота вращения мешалки – 350 об·мин$^{-1}$. Для исследований использовали раствор, содержащий 40, 50, 60 % ТЭА и нормы расхода KCl – 100, 120, 140, 160 % против стехиометрии. Как видно из результатов, представленных в табл. 3, степень использования иона K^+ зависит от концентрации ТЭА и нормы расхода хлористого калия от стехиометрии. Независимо от нормы расхода высокая степень конверсии наблюдается при использовании 60 %-ного раствора ТЭА. Содержание сульфата калия в твердой фазе достигает 91,1, 92,76 % при норме расхода KCl 140 и 160 % соответственно от стехиометрии. При использовании 40 %-ного раствора ТЭА наблюдается низкая степень разложения фосфогипса хлористым калием при всех исследуемых нормах расхода KCl от 100 до 160 %. Этот показатель составляет только 45–52 %. Следует отметить, что в этом случае при норме расхода 100 и 120 % в твердой фазе содержание K_2SO_4 составило только 2,8 и 10,7 % соответственно. Таким образом, оптимальными условиями получения сульфата калия путем разложения фосфогипса хлористым калием в присутствии триэтаноламина являются: температура – 20 ºС, время перемешивания – 3 ч, 60 %-ный раствор ТЭА. Содержание K_2SO_4 составляет 91–93 %, а степень использования иона K^+ – 90–92 %.

Таблица 3. **Качественно-количественные показатели процесса конверсии КС1 и фосфогипса в присутствии триэтаноламина (температура – 20 ºС, время перемешивания – 3 ч)**

Table 3. **Qualitative and quantitative characteristics of KCl and phosphogypsum conversion process (temperature – 20 ºC, agitation time – 3 h)**

Норма расхода KCl, %	Концентрация ТЭА, %	Состав жидкой фазы, мас. %			Состав твердой фазы, мас. %			Степень использования K^+, %
		KCl	$CaCl_2$	$CaSO_4$	KCl	$CaSO_4$	K_2SO_4	
100	40	11,2	4,9	0,14	5,4	91,7	2,8	45,8
120	40	10,5	5,8	0,13	5,5	83,8	10,7	47,0
140	40	13,6	4,6	0,12	5,1	38,5	61,4	47,6
160	40	14,1	3,8	0,41	4,5	31,6	63,6	52,2
100	50	8,6	5,4	0,14	3,3	38,5	58,2	57,9
120	50	8,5	4,9	0,10	3,8	33,8	62,5	65,3
140	50	7,3	5,7	0,11	8,1	26,9	64,9	68,6
160	50	12,3	3,4	0,35	7,3	25,8	66,9	71,4
100	60	4,1	7,1	0,14	5,6	19,2	75,1	65,8
120	60	3,9	6,5	0,15	7,5	10,1	82,5	89,8
140	60	5,1	5,9	0,15	4,3	4,6	91,1	90,3
160	60	5,8	5,1	0,15	2,0	5,2	92,76	91,7

Заключение. В результате проведенных исследований определены оптимальные условия получения сульфата калия путем взаимодействия хлорида калия и сульфата кальция в присутствии триэтаноламина по схеме: $2KCl + CaSO_4 \cdot 2H_2O \rightarrow K_2SO_4 + CaCl_2 + 2H_2O$: температура – 20–25 °С, время перемешивания – 3 ч; концентрация триэтаноламина – 60 %; норма расхода KCl – 140–160 % сверх стехиометрии при частоте вращения мешалки – 350 об·мин$^{-1}$. Содержание K_2SO_4 составляет 91–93%, а степень использования иона K^+ – 90–92 %. Показано, что в водной среде взаимодействие между KCl и $CaSO_4$ идет с получением сингенита, а в присутствии триэтаноламина образуется сульфат калия. Повышение температуры замедляет взаимодействие хлорида калия и сульфата кальция.

Поскольку ТЭА в изученном процессе конверсии загрязняется растворимыми солями, это неизбежно вынуждает провести дополнительные исследования, посвященные вопросам регенерации и путям его дальнейшего использования. Эти вопросы изучаются и будут освещены в наших дальнейших публикациях.

Список использованных источников

1. Свешникова, В. Н. Исследования растворимости солей во взаимной системе $CaSO_4$–KCl–H_2O при 55 °С / В. Н. Свешникова // Изв. АН СССР, ОХН. – 1952. – № 1. – С. 44–51.

2. Свешникова, В. Н. К вопросу об образовании хлористого кальция в природных рассолах / В. Н. Свешникова // Докл. АН СССР. – 1951. – № 3. – С. 447–450.

3. Шиллер, М. Получение сульфата калия конверсией хлористого калия гипсом / М. Шиллер: Автореф. … канд. техн. наук. – М., 1983. – 15 с.

4. Способ получения бесхлорных калийных удобрений. А.с. 1247375 СССР, кл С 05 Д 1/02/ В. Т. Орлова, И. И. Гончарик, И. Н. Лепешков, Х. М. Александрович; заявитель Орлова В. Т., Гончарик И. И., Лепешков И. Н., Александрович Х. М.; заявил 13.02.1985; опубл. 30.07.86.

5. Изучение взаимной системы K^+, Ca^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-} при 0 °С в 10, 20 и 30%-ных водно-аммиачных растворах / И. Д. Соколов [и др.] // Труды НИИГ. – 1976. – Вып. 78. – С. 13–34.

6. Получение сингенита конверсией фосфогипса раствором хлорида калия с добавлением гликолей / И. И. Гончарик [и др.] // – ЖПХ – 1995. – Т. 68, Вып. 5. – С. 1419–1422.

References

1. Sveshnikova V. N., “Investugation of salt solubility in mutual system $CaSO_4$ –KCl – H_2O at 55°C”, *Izvestiia Akademii nauk SSSR. Otdelenie khimicheskikh nauk* [Bulletin de l’Academie des sciences de L’URSS. Classe des sciences chimiques], 1952, no. 1, pp. 44–51.

2. Sveshnikova V. N., “Revisiting calcium chloride formation in the natural brines”, *Doklady Akademii Nauk SSSR* [Proceedings of the USSR Academy of Sciences], 1951, no. 3, pp. 447–450.

3. Shiller M., "Obtaining potassium sulfate by conversion of potassium chlorine by gypsum", Abstract of Ph. D. dissertation, Technology of inorganic substances, Moscow Chemical Technology Institute named after D. I. Mendeleyev, Moscow, RU, 1983.

4. Orlova V. T., Goncharik I. I., Lepeshkov I. N., Aleksandrovich H. M., Order of Lenin Institute of General and Inorganic Chemistry named after N. S. Kurnakov, *Sposob polucheniia beskhlornykh kaliinykh udobrenii* [The method of non-chlorine potassium fertilizers production], Patent Database of the USSR, Moscow, USSR, 1986, Pat. 1247375.

5. Sokolov I. D., "Study of the mutual system K^+, Ca^{2+},Cl^-, SO_4^{2-} at 0 °C the 10, 20, 30 % water ammonia solution", *Trudy NIIG* [Proceedings of VSIIG], 1976, no. 78, pp. 13–34.

6. Goncharik I. I., "Singenit preparation by conversion of phosphogypsum with addition of glycols", *Zhurnal prikladnoi khimii* [Russian Journal of Applied Chemistry], 1995, vol. 68, no. 5, pp. 1419–1422.

Информация об авторах

Гончарик Инна Иосифовна – канд. техн. наук, ст. науч. сотрудник, Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: igiclpns@rambler.ru.

Шевчук Вячеслав Владимирович – д-р хим. наук, зав. отделом, Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shevchukslava@rambler.ru.

Кудина Ольга Анатольевна – науч. сотрудник, Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga091@rambler.ru.

Можейко Фома Фомич – член-кор., д-р хим. наук, Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Ina I. Hancharyk – Ph. D. (Engineering), Senior Researcher, Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: igiclpns@rambler.ru.

Viacheslau V. Shevchuk – D. Sc. (Chemistry), Head of Department, Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shevchukslava@rambler.ru.

Volha A. Kudzina – Researcher, Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga091@rambler.ru.

Foma F. Mozheyko – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Chemistry), Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus.

ISSN 1561-8331(print.)
УДК 628.162

Поступила в редакцию 20.02.2017
Received 20.02.2017

П. А. Клебеко[1], В. И. Романовский[2]

[1]Центральный научно-исследовательский институт комплексного использования водных ресурсов, Минск, Беларусь
[2]Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

ОЧИСТКА ПОДЗЕМНЫХ ВОД ОТ ЖЕЛЕЗА МОДИФИЦИРОВАННЫМИ АНТРАЦИТАМИ

Аннотация: Одним из актуальных направлений повышения эффективности очистки подземных вод является поиск новых материалов, обладающих большей селективностью и каталитической активностью к извлечению ионов железа и марганца. На сегодняшний день в качестве загрузки наибольшее распространение нашли следующие материалы: кварцевый песок, щебень, антрацит и др. Объектом исследований служили антрациты. Гранулы антрацитов покрывали оксидами железа и марганца методом экзотермического горения в муфельной и СВЧ-печи. Изучен элементный состав поверхности полученных материалов. Представлены результаты сравнительного анализа полученных материалов с исходными антрацитами для очистки подземных вод от железа и марганца. Данные экспериментальных исследований, проведенных на водоканале, позволили сделать ряд выводов об эффективности использования полученных материалов.

Ключевые слова: подземные воды, водоподготовка, обезжелезивание, антрацит, метод экзотермического горения, модифицированный фильтр

Для цитирования: Клебеко, П. А. Очистка подземных вод от железа модифицированными антрацитами / П. А. Клебеко, В. И. Романовский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 104–109.

P. A. Klebeko[1], V. I. Romanovsky[2]

[1] Central Research Institute for Complex Use of Water Resources, Minsk, Belarus
[2] Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus

CLEANING THE GROUND WATER FROM IRON USING MODIFIED ANTHRACITE

Abstract: One of the important ways to increase the efficiency of purification of groundwater is a search for new materials with greater selectivity and catalytic activity for removal of iron and manganese ions. Today, the following materials are most widely used as a load: quartz sand, anthracite and others. The anthracites were selected as research object. The anthracite pellets were coated with iron and manganese oxides by exothermic combustion in a muffle furnace and microwave furnace. The elemental composition of the surface of the obtained materials was investigated. The results of comparative analysis of the obtained materials in comparison with the initial anthracite for cleaning groundwater from iron and manganese are presented. A number of conclusions about the effectiveness of the obtained materials were made based on the experimental studies conducted on the water utilities.

Keywords: ground water, water treatment, removal of iron, anthracite, exothermic combustion method, a modified filter

For citation: Klebeko P. A., Romanovsky V. I. Cleaning the ground water from iron using modified anthracite. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 104–109 (In Russian).

Введение. Основным источником централизованного водоснабжения сельских и городских поселений Республики Беларусь являются подземные воды, имеющие практически повсеместно повышенное содержание железа, что не позволяет использовать их без очистки как для хозяйственно-питьевых, так и для технических целей. На рис. 1 изображено среднее содержание железа в подземных водах по областям Республики Беларусь.

При повышенном содержании железа природная вода должна подвергаться специальной обработке, т. е. обезжелезиванию. Выбор метода обезжелезивания и его технологических параметров является сложной технико-экономической задачей и зависит от химических свойств и обрабатываемых объемов воды. Наибольшее распространение по республике получили безреагентные аэрационные методы. Их распространенность обусловлена отсутствием необходимости

© Клебеко П. А., Романовский В. И., 2017

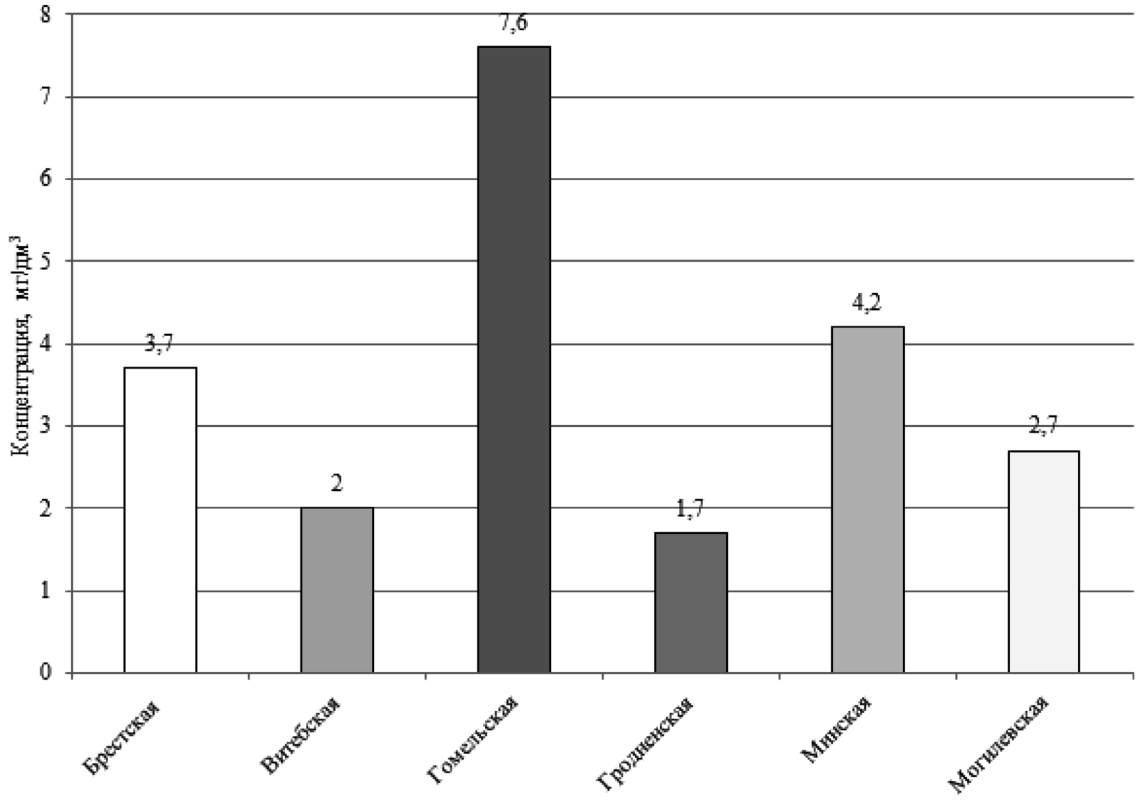


Рис. 1. Среднее содержание железа в подземных водах по областям Республики Беларусь, мг/дм^3

Fig. 1. The average iron content in the ground water by regions of the Republic of Belarus, mg/dm^3

введения в обрабатываемую воду химических реагентов (окислителей), что позволяет иметь низкие эксплуатационные издержки.

Наиболее широко используется метод упрощенной аэрации с последующим фильтрованием, сущность которого заключается в изливе воды с высоты не менее 0,5 м непосредственно на фильтрующую загрузку, что позволяет достичь концентрации растворенного в воде кислорода до 4,0–6,0 мг/дм^3 (~50% от насыщающего значения). Типовые разработки предусматривают производительность от 12,0 тыс. м^3/сут и выше. В качестве фильтрующих загрузок могут использоваться кварцевые пески, дробленый и недробленый керамзит, антрацит, шлаки, колотый гранитный щебень и др. Гранулометрический состав фильтрующих загрузок (1–2–5–10 мм), высота слоя загрузок (0,7–2,2 м), скорость фильтрации (4,0–5,0–15,0–20,0 м/ч), фильтроцикл (0,5–4,0 сут) зависят от химического состава воды и в первую очередь от содержания железа.

Основными видами фильтрующей загрузки в фильтрах являются: гранитный щебень, кварцевый песок, зернистый МФГ (материал фильтрующий из гранитных пород; калиброванные фракции) и МФГК (материал фильтрующий из гранитных и кварцевых пород; калиброванные фракции), сорбент АС, керамзит, доломит. Для повышения эффективности обезжелезивания подземных вод ведется поиск новых материалов, обладающих большей селективностью и каталитической активностью по извлечению ионов железа и марганца. В ряде литературных источников [1–4] приведен анализ использования альтернативных материалов загрузки.

Цель данной работы – получение модифицированных каталитических загрузок фильтров обезжелезивания и анализ эффективности их работы.

Экспериментальная часть. При выполнении работы использовали антрациты, покрытые оксидами железа и марганца. Органическая масса антрацита характеризуется сравнительно большой влажностью (3–4%), низким выходом летучих веществ (до 9%). Элементный состав

антрацита составляет (%): 94–97 C, 1,0–3,0 H и по 1,0–1,5 O и N. Антрацит не содержит гуминовых кислот, а кислород связан преимущественно в виде CO-групп.

Синтез оксидного каталитического покрытия на поверхности кускового антрацита фракции производился методом экзотермического горения в водных растворах (SCS) [5–8] стехиометрических смесей нитратов железа или марганца и соответствующего восстановителя: лимонной кислоты для синтеза Fe_2O_3, глицина – для Mn_2O_3. Соотношение восстановителя к окислителю $\varphi = 1{,}5$. Исходные компоненты растворяли в дистиллированной воде, после чего в полученные растворы при постоянном перемешивании медленно приливали аммиак до получения pH раствора 5,5–6. Исходные растворы при постоянном перемешивании переносили в термостойкие стаканы, содержащие кусковой антрацит так, чтобы слой раствора покрывал антрацит на 1–2 мм. Затем стаканы с раствором и антрацитом помещали в печь и подогревали для более быстрого удаления воды. Синтез оксидного покрытия производили двумя способами. В первом случае синтез вели в микроволновой печи, подогревая образцы до окончания реакции экзотермического синтеза. Во втором случае стаканы с антрацитом, покрытым высушенными гелями прекурсоров, помещали в предварительно разогретую до 600 °C муфельную печь. В печи прекурсор на поверхности антрацита загорался – протекала реакция взаимодействия нитрата железа и лимонной кислоты. В обоих случаях после реакции горения антрацит приобретал темно-красную или темно-коричневую окраску. Далее антрацит просеивали, отмывали проточной водой и высушивали.

Морфологию и элементный состав поверхности образцов осуществляли методом EDX на сканирующем электронном микроскопе JEOLJSM – 5610LV (Япония), оснащенном системой химического микрорентгеноспектрального анализа JED22-01 с точностью до 0,5%.

В результате были получены следующие образцы: 1 – исходный антрацит (эксплуатируемый); 2 – антрацит с осажденными оксидами железа и алюминия; 3, 4 – антрацит с осажденными оксидами железа в муфельной печи; 5, 6 – антрацит с осажденными оксидами железа в СВЧ-печи; 7 – антрацит с осажденными оксидами марганца.

В качестве каталитических загрузок использовали образцы модифицированных антрацитов 1, 5, 6 и 7. Элементный состав поверхности полученных материалов представлен на рис. 2.

В модифицированных образцах 6 и 7 содержание железа в форме Fe_2O_3 составляет соответственно 51,1 и 35,5%, что в 4,44 и 3,09 раза выше чем в исходном образце. В них содержится также незначительное количество оксидов кальция (2,4 и 3,1%), алюминия (14,4 и 15,4%), кремния (10,6 и 16,0%) и др.

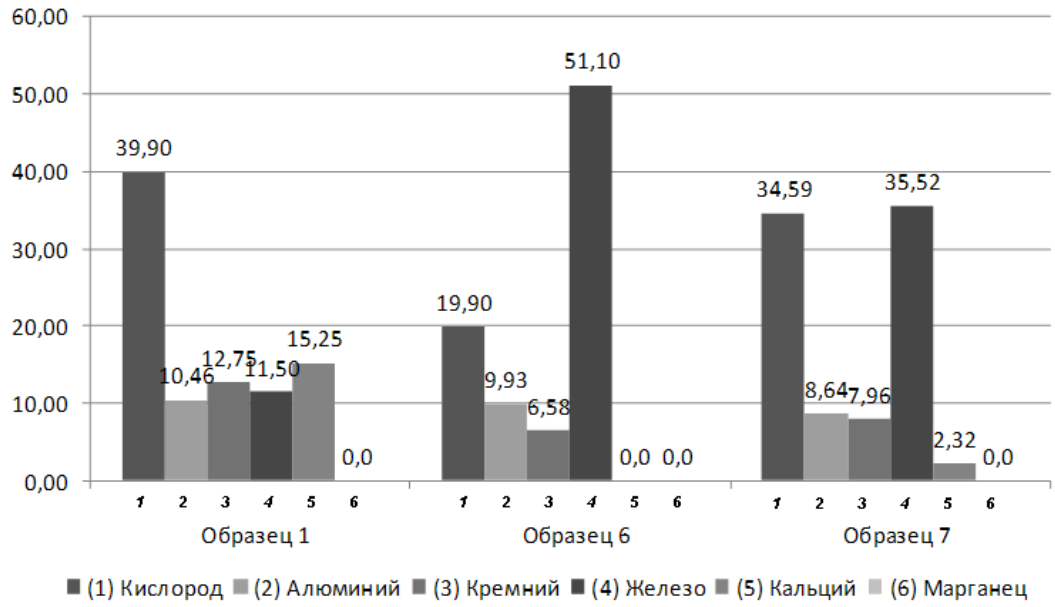


Рис. 2. Содержание элементов на поверхности полученных образцов, %

Fig. 2. The element content on the surface of the obtained samples, %

Испытания обезжелезивания подземных вод с использованием модифицированных загрузок были проведены на станции обезжелезивания Лунинецкий КУП ВКХ «Водоканал». Испытания проводили на модельной установке, расположенной в здании фильтров обезжелезивания и представляющей собой колонки диаметром 20 мм и высотой 1,7 м. Высота загрузки составляла: 0,5 м верхний каталитический слой и 1,0 м нижний фильтрующий слой (кварцевый песок).

Вода, поступающая в установку на фильтрование, аэрировалась в градирне с хордовой насадкой. Установленная начальная скорость фильтрования составляла 12,0 м/ч; время фильтроцикла – 100 ч.

Обезжелезивание воды протекает на фильтрующей загрузке, при которой за счет растворенного в воде кислорода происходит обрастание материала оксидной каталитической пленкой и окисление железа до нерастворимой окисной формы, что приводит к выпадению железа в осадок на фильтрующей загрузке. Данные фильтрующие загрузки начинают эффективно работать только после наращивания на их частицах слоев гидроокиси железа $Fe(OH)_3$, работающей как катализатор дальнейшего окисления. Удержанное на загрузке железо удаляется в дренаж в дальнейшем цикле регенерации установки. Для восстановления исходных рабочих характеристик фильтрующей загрузки в цикле регенерации происходит ее обратная промывка.

Анализ состава воды проводили в аккредитованной лаборатории Лунинецкого КУП ВКХ «Водоканал» (Беларусь) по следующим показателям: железо общее, железо (II), железо (III). Результаты испытаний полученных образцов в качестве каталитической загрузки представлены на рис. 3 и 4. Анализ эффективности работы каталитической загрузки проводили по остаточному содержанию Fe^{2+} (рис. 3), а эффективность работы фильтра в целом по остаточному содержанию Fe общего (рис. 4).

На основании полученных экспериментальных данных были построены уравнения регрессии, описывающие зависимость содержания железа общего в фильтрате ($C(Fe_{общ})$, мг/дм^3) и содержания железа двухвалентного в фильтрате ($C(Fe^{2+})$, мг/дм^3) от времени фильтрования (T, ч) и содержания железа на поверхности модифицированного антрацита (υ_{Fe}, %). Уравнения построены для интервала значений: T = 0–100 ч, υ_{Fe} = 11,5–51,1%.

$$C(Fe_{общ}) = 0{,}4508 - 0{,}01808T - 0{,}01374\upsilon_{Fe} + 0{,}0002567T^2 + 0{,}0002494T\upsilon_{Fe} + 0{,}0001342\upsilon_{Fe}^2, \quad (1)$$

$$C(Fe^{2+}) = 0{,}3086 - 0{,}0167T - 0{,}009306\upsilon_{Fe} + 0{,}0002924T^2 + 0{,}0001792T\upsilon_{Fe} + 0{,}00008802\upsilon_{Fe}^2. \quad (2)$$

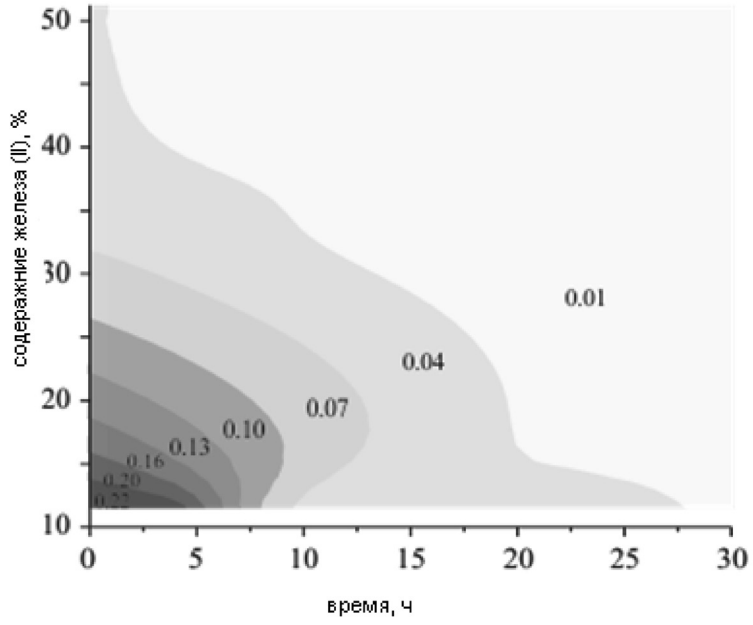


Рис. 3. Остаточное содержание $Fe_{общ}$, мг/дм^3 в фильтрате

Fig. 3. Residual content of Fe_{tot}, mg/dm^3 in the filtrate

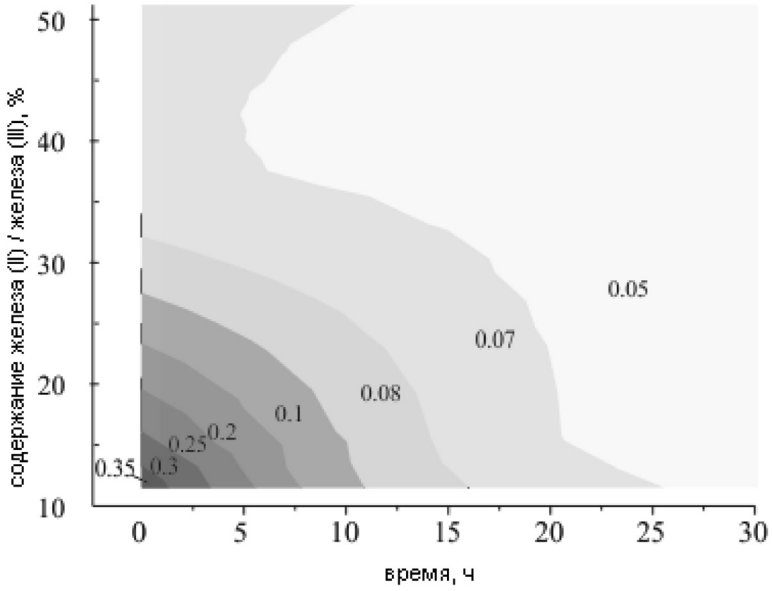


Рис. 4. Остаточное содержание Fe^{2+}, мг/дм^3 в фильтрате

Fig. 4. Residual content of Fe^{2+}, mg/dm^3 in the filtrate

Заключение. Полученные результаты испытаний свидетельствуют, что при использовании образцов антрацитов 5 и 6, покрытых оксидами железа, остаточная концентрация $Fe_{общ}$ в первых порциях фильтрата в 3,4 раза меньше, чем при использовании исходного антрацита (образец 1); при использовании образца 7, покрытого оксидами марганца, остаточная концентрация $Fe_{общ}$ в первых порциях фильтрата в 2,8 раза меньше, чем при использовании исходного антрацита (образец 1); зарядка поверхности исходного антрацита (образец 1) происходит через 6 ч после включения фильтра в работу, в то время как модифицированные антрациты обеспечивают высокую эффективность в первых порциях воды; при увеличении содержания железа на поверхности от 11 до 35% приводит к повышению эффективности окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} до 20%, дальнейшее же увеличение содержания железа до 52% повышает эффективность окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} всего на 2%; снижение установленной скорости фильтрования (12,5 м/ч) на 50% происходило по прошествии 54 ч работы фильтра, через 100 ч скорость фильтрации снизилась до 0,5 м/ч; основная масса марганца вымывается из загрузки в течение 24 ч и достигает норматива содержания в питьевой воде (менее 0,1 мг/дм^3) через 43 ч.

Таким образом, использование полученных материалов позволяет значительно снизить объем (высоту слоя) используемой загрузки и повысить эффективность очистки при первом запуске фильтров после регенерации.

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. Barloková, D. Removal of Iron and Manganese from Water Using Filtration by Natural Materials / D. Barloková, J. Ilavský // Polish J. of Environ. Stud. – 2010. – Vol. 19, N 6. – P. 1117–1122.

2. Ilavský, J. Chémia vody a hydrobiológia/ J. Ilavský, D. Barloková, F. Biskupič // STU. Bratislava, 2008. – 303 p.

3. Barloková, D. Natural Zeolites in Water Treatment / D. Barloková, J. Ilavský. Vodní hospodářství. – 2007. – № 6. – P. 213.

4. Doula, M. K. Removal of Mn_{2+} Ions from Drinking Water by Using Clinoptilolite and Clinoptilolite-Fe Oxide System / M. K. Doula // Water Research. – 2006. – Vol. 40, № 17. – P. 3167.

5. Patil, K. C. Solution combustion synthesis of nanoscale oxides and their composites/ K. C. Patil, T. Mimani // Mater. Phys. Mech. – 2001. – № 4. – P. 134–137.

6. Patil, K. Combustion synthesis / K. Patil, S. Aruna, S. Ekambaram // Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. – 1997. – № 2. – P. 158.

7. Patil, K. Combustion synthesis: an update / K. Patil, S. Aruna, T. Mimani // Curr. Opin. Sol. State Mater. Sci. – 2002. – № 6. – P. 507.

8. Mukasyan, A. S. Combustion synthesis and nanomaterials/ A. S. Mukasyan, P. Epstein, P. Dinka // Proc. Combus. Inst. – 2007. – Vol. 31. – P. 1789–1795.

References

1. Barloková D., Ilavský J., "Removal of Iron and Manganese from Water Using Filtration by Natural Materials", *Polish Journal of Environmental Studies*, 2010, vol. 19, no. 6, pp. 1117–1122.

2. Ilavský, J., Barloková, D., Biskupič, F., *Chémia vody a hydrobiológia*, STU, Bratislava, SK, 2008.

3. Barloková D., Ilavský J., "Natural Zeolites in Water Treatment", *Vodní hospodářství*, 2007, no. 6, p. 213.

4. Doula M. K., "Removal of Mn2+ Ions from Drinking Water by Using Clinoptilolite and Clinoptilolite-Fe Oxide System", *Water Research*, 2006, vol. 40, no. 17, p. 3167.

5. Patil K. C., Mimani T., "Solution combustion synthesis of nanoscale oxides and their composites", *Materials physics and mechanics*, 2001, no. 4, pp. 134–137.

6. Patil K., Aruna S., Ekambaram S., "Combustion synthesis", *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 1997, no. 2, p. 158.

7. Patil K., Aruna S., Ekambaram S., "Combustion synthesis: an update", *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2002, no. 6, p. 507.

8. Mukasyan A. S., Epstein P., Dinka P., "Combustion synthesis and nanomaterials", *Proceedings of the Combustion Institute*, 2007, no. 31, pp. 1789–1795.

Информация об авторах

Клебеко Павел Альбинович – магистр техн. наук, аспирант, Центральный НИИ комплексного использования водных ресурсов (ул. Славинского, 1, корп. 2, 220086, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavkle@mail.ru.

Романовский Валентин Иванович – канд. техн. наук, ст. преподаватель, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v-romanovski@ya.ru.

Information about the autors

Pavel A. Klebeko – M. Sc. (Engineering), Ph. D. student, Central Research Institute for Complex Use of Water Resources, (1/2, Slavinskogo Str., 220086, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavkle@mail.ru.

Valiantsin I. Ramanouski – Ph. D. (Engineering), Senior Lecturer, Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v-romanovski@ya.ru.

ISSN 1561-8331(print.)
УДК 676.085.4

Поступила в редакцию 20.02.2017
Received 20.02.2017

И. А. Латышевич[1], Н. Р. Прокопчук[2], А. Ю. Клюев[1], Н. Г. Козлов[1]

[1]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

СВОЙСТВА ЛАКОВЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ТЕРПЕНОМАЛЕИНОВЫХ СМОЛ

Аннотация: Создание электротехнических изделий с повышенными технико-экономическими показателями требует дальнейшего совершенствования электроизоляционных материалов. В связи с широким внедрением автоматических методов намотки большое значение имеет разработка лаковых покрытий, обеспечивающих надежность изоляции при значительных механических воздействиях. Данное исследование посвящено повышению эксплуатационных свойств электроизоляционных лаков путем разработки технологий высокоэффективных вторичных продуктов терпеномалеиновых смол (смол ТМС) и термоотверждаемых композиций на их основе. В процессе выполнения работы изучены физико-химические свойства смол ТМС, модифицированных солями тяжелых металлов (ацетатами Co, Mn и Zn), такие как кислотное число (КЧ, мг КОН/г), температура размягчения ($T_р$, °С), вязкость ($ν^{20}$) и температура деструкции ($T^{ср}_Д$, °С). Исследовано влияние полученных смол ТМС на физико-механические свойства лаковых покрытий на их основе: толщина пленки (мкм), твердость лакового покрытия (усл. ед.) и антикоррозионная стойкость.

Ключевые слова: терпеномалеиновая смола, ацетат кобальта, ацетат марганца, ацетат цинка, эпоксидная смола, лаковое покрытие

Для цитирования: Свойства лаковых покрытий на основе модифицированных терпеномалеиновых смол / И. А. Латышевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. - № 3. – С. 110–114.

I. A. latyshevich[1], N. R. Prokopchuk[2], A. Yu. Kliuyeu[2], N. G. Kozlov[1]

[1]Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus

PROPERTIES OF THE LAQUER COATINGS BASED ON MODIFIED TERPENOMALEINIC RESINS

Abstract: The development of electrical products with increased technical and economic indicators requires further improvement of electrical insulating materials. Due to the wide introduction of automatic winding methods, it is of great importance to develop varnish coatings that ensure the reliability of insulation under significant mechanical stresses. This study was devoted to the development of the operational properties of electrical insulating varnishes by developing technologies for high-efficiency secondary products of terpenomaleinic resins (TMS resins) and thermosetting compositions based on them. In this work, physical and chemical properties of TMS resins modified with heavy metal salts such as acid number (AN, mg of KOH/g), softening temperature (T_s, °C), viscosity ($ν^{20}$) and destruction temperature (T_d, °C) were studied. The effect of the obtained TMS resins on physical and mechanical properties of lacquer coatings based on them such as film thickness (μm), hardness of the varnish coating (conventional units) and the corrosion resistance was studied. The effect of TMS resins modified with salts of heavy metals (Co, Mn and Zn acetates) on physical and mechanical properties of lacquer coatings based on them was studied as well.

Keywords: terpenomaleinic resin, cobalt acetate, manganese acetate, zinc acetate, epoxide resin, lacquer coatings

For citation: Latyshevich I. A., Prokopchuk N. R., Kliuyeu A. Yu., Kozlov N. G. Properties of the laquer coatings based on modified terpenomaleinic resins. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 110–114 (In Russian).

Введение. Создание электротехнических изделий с повышенными технико-экономическими показателями требует дальнейшего совершенствования электроизоляционных материалов. В связи с широким внедрением автоматических методов намотки большое значение имеет разработка лаковых покрытий, обеспечивающих надежность изоляции при значительных механических воздействиях. В Беларуси электроизоляционные лаки не производятся, но активно используются (основными потребителями таких лаков являются ОАО «Гомелькабель» и ОАО «Торгмаш» (г. Барановичи)), поэтому актуальными являются исследования, посвященные разработке новых

термоотверждаемых покрытий с улучшенными эксплуатационными свойствами и организация их производства.

Высокие технологические температуры отверждения лаковых композиций (200–450 °С) позволяют использовать в их рецептурах эпоксидные смолы, а в качестве отвердителя – терпеноидные смолы следующих функциональных групп: карбоксильных, ангидридных и гидроксильных [1].

Проведенные исследования [2–5] по получению термоотверждаемых композиций на основе эпоксидных смол и смол ТМС показали, что они образовывали лаки, которые обладали низкими показателями по механической прочности, диэлектрике и устойчивости к термоокислительной деструкции, что значительно снижало их область применения в электротехнической промышленности.

Поэтому актуальны исследования по повышению эксплуатационных свойств электроизоляционных лаков путем разработки технологий высокоэффективных вторичных продуктов смол ТМС и термоотверждаемых композиций на их основе. Разработанные композиции являются экспортоориентированными (ЗАО «Микропровод» и ОАО «НП Подольсккабель» – г. Подольск, Российская Федерация; ОАО «СП «Волгамаг» – г. Рыбинск, Российская Федерация; ООО «ТК Волга кабель» – г. Самара, Российская Федерация).

Материалы и методы исследований. Как показали проведенные исследования [6, 7], химическое модифицирование смолы ТМС позволяет получать лаковые покрытия с улучшенными физико-механическими свойствами. Условия же химического модифицирования ТМС просты и не требуют сложного технического оборудования.

Основными направлениями нашего исследования были: выбор конкретного химического модификатора ТМС; подбор оптимальных условий химического модифицирования ТМС конкретным модификатором; исследование влияния глубины химического модифицирования ТМС на физико-механические свойства получаемых лаковых покрытий; разработка рецептуры термоотверждаемых композиций на основе модифицированных терпеномалеиновых смол. Также было изучено влияние смол ТМС, модифицированных солями тяжелых металлов (ацетатами Co, Mn и Zn), на физико-механические свойства лаковых покрытий на их основе.

Для проведения исследований использовали смолу ТМС со следующими физико-химическими свойствами: КЧ = 320,0 мг КОН/г, $T_р$ = 60 °С [8]. Смолу ТМС модифицировали ацетатами Co, Mn и Zn при T = 190±5 °С в течение 1,5–4 ч с последующей отгонкой под вакуумом 0,0026 МПа остатков нейтральных веществ, уксусной кислоты и воды. Контроль реакции проводили по изменению КЧ реакционной смеси.

Физико-химические свойства модифицированных ТМС определяли по методике [9]. Для определения параметров термоокислительной деструкции исследованных продуктов были использованы методы динамической термогравиметрии [10–14].

Результаты и их обсуждение. Физико-химические свойства исследованных продуктов представлены на рисунке (*а, б, в*).

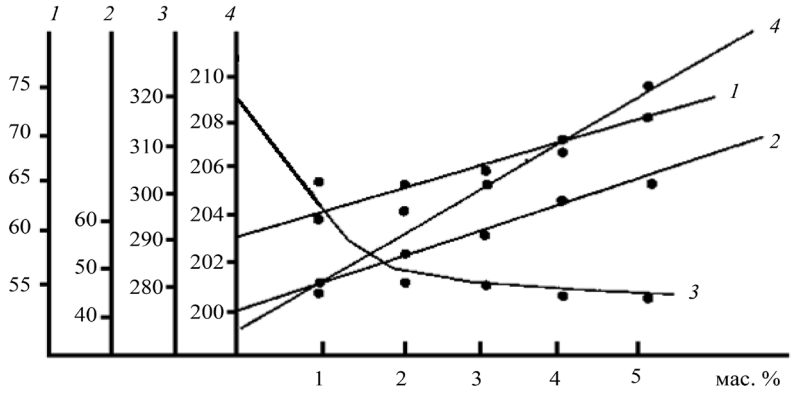
Как видно из данных, что с увеличением глубины модифицирования смолы ТМС ацетатами Co, Mn и Zn (от 1,0 до 5,0 мас.%) наблюдаются изменения ее физико-химических свойств.

С увеличением глубины модификации смолы ТМС ацетатом Co (рисунок, *а*) наблюдается повышение $T_р$ – от 60,0 до 66,0 °С, ν^{20} – от 40 до 60,0 сСт, $T_Д^{ср}$ – от 173,0 до 208,0 °С, при этом КЧ снижается с 320,0 до 280,0 мг КОН/г .

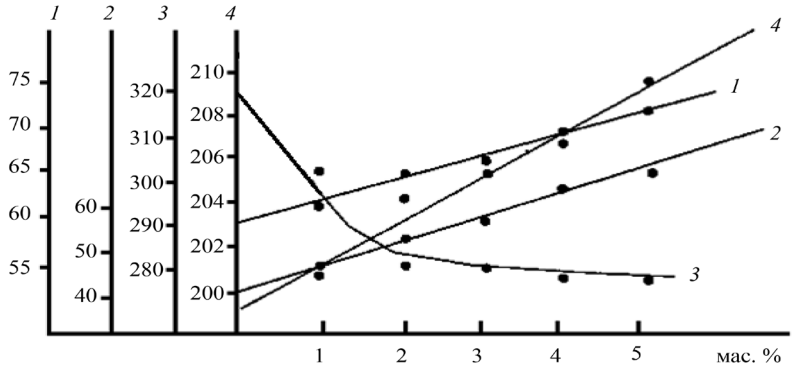
Из рисунка, *б* видно, что с увеличением глубины модификации смолы ТМС ацетатом Mn происходит повышение $T_р$ – от 60,0 до 70,0 °С, ν^{20} – от 40,0 до 65,0 сСт, $T_Д^{ср}$ – от 173,0 до 210,0 °С, а КЧ снижается с 320,0 до 278,0 мг КОН/г.

Данные рисунка, *в* показывают, что с увеличением глубины модификации смолы ТМС ацетатом Zn повышаются $T_р$ – от 60,0 до 73,0 °С, ν^{20} – от 40,0 до 68,0 сСт, $T_Д^{ср}$ от – 173,0 до 213,0 °С и также при этом КЧ снижается с 320,0 до 268,0 мг КОН/г. Физико-химические свойства полученных образцов отличаются незначительно, что видно из графиков.

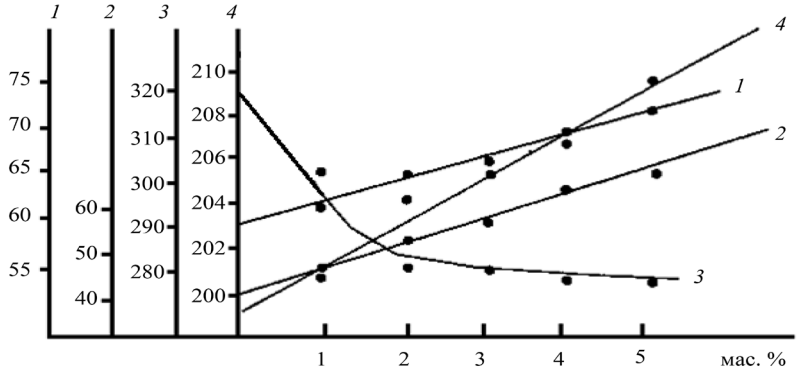
Для модифицированных смол ТМС наблюдаются линейные корреляции между величинами, характеризующие начало процесса термоокислительной деструкции в смолах и их $T_р$. С повышением $T_р$ модифицированной смолы происходит соответствующее увеличение ее $T_Д^{ср}$.



а



б



в

Свойства ТМС, модифицированной различными количествами $Co(CH_3COO)_2$ – *а*, $Mn(CH_3COO)_2$ – *б*, $Zn(CH_3COO)_2$ – *в*: *1* – $T_р$, °С; *2* – $ν^{20}$; *3* – КЧ, мг KOH/г; *4* – $T_Д^{ср}$, °С

Properties of TMS resin modified with different amounts of $Co(CH_3COO)_2$ – *а*, $Mn(CH_3COO)_2$ – *б*, $Zn(CH_3COO)_2$ – *в*: *1* – T_r, °С; *2* – $ν^{20}$; *3* – КЧ, мg KOH/q; *4* – T_d^{sr}, °С

На основе смолы ТМС, модифицированной 1,0, 3,0, 5,0 мас.% ацетатами Co, Mn и Zn, были приготовлены термоотверждаемые композиции и изучены физико-механические свойства лаковых покрытий.

В качестве термореактивного полимера композиции выбрали эпоксидную смолу Э-40, имеющую ряд ценных свойств: низкую усадку при отверждении, высокую адгезию к металлам, высокие физико-химические и диэлектрические свойства. Термоотверждаемые композиции получены по методике [6, 7]. В табл. 1 и 2 приводится оптимальный состав, физико-химические и физико-механические свойства лаковых покрытий, полученных с применением ТМС, модифицированной ацетатами металлов.

Таблица 1. **Состав термоотверждаемых композиций**

Table 1. **Formulation of thermosetting compositions**

Компонент	Количество, мас.%
Модифицированная ТМС	12,0
Смола Э-40	18,0
Пластификатор	5,0
Растворитель	65,0

Таблица 2. **Свойства термоотверждаемых композиций и лаковых покрытий**

Table 2. **Properties of thermosetting compositions and laquer coatings**

Свойства	ТМС модифицированная, мас.%								
	1,0 AcCo	3,0 AcCo	5,0 AcCo	1,0 AcMn	3,0 AcMn	5,0 AcMn	1,0 AcZn	3,0 AcZn	5,0 AcZn
Термоотверждаемые композиции									
Концентрация композиции, %	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Температура отверждения, °С	200±5	200±5	200±5	200±5	200±5	200±5	200±5	200±5	200±5
Время отверждения, мин	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Лаковые покрытия									
Толщина плёнки, мкм	72	71	73	70	71	72	73	71	72
Твердость лакового покрытия, усл.ед.	0,91	0,93	0,92	0,92	0,94	0,93	0,94	0,96	0,94
Антикоррозионная стойкость	Коррозия отсутствует								

Исследования физико-механических свойств лаковых покрытий на медных пластинах проводили в лабораториях Белорусского государственного технологического университета (Минск, Республика Беларусь). Из данных табл. 2 видно, что наиболее эффективным из приведенных модификаций ТМС, улучшающей физико-механические свойства лаковых покрытий, является модифицирование смолы ТМС 1–5 мас.% ацетатами Zn. Так, твердость лаковых покрытий, полученных с использованием таких модифицированных смол ТМС составляет соответственно 0,94–0,96 усл. ед.

Выводы. Как показывают проведенные исследования, использование для химического модифицирования смолы ТМС ацетата Zn позволяет получать лаковые покрытия с высокими физико-механическими свойствами. Условия же, при которых приходит химическое модифицирование смолы ТМС, просты и не требуют сложного технического оборудования.

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. Николаев, А. Ф. Синтетические полимеры и пластические массы на их основе / А.Ф. Николаев. – М. : Химия, 1966. – 768 с.

2. Способ получения аддукта Дильса-Альдера : pat. PL125622, Poland : IPC C09F 1/04 / Matynia T. ; publ. date: 31.03.1984.

3. Method of obtaining a hardener for epoxy resins : pat. PL129726, Poland : IPC C08K 5/10 / M. Tadeusz ; publ. date: 30.06.1984.

4. Matynia, T. Аддукты Дильса-Альдера в качестве отвердителей эпоксидных смол / T. Matynia // J. Appl. Polym. Sci. – 1980. – Vol. 25, № 1. – P. 1–13.

5. Matynia, T. Аддукты Дильса-Альдера терпеновых углеводородов в качестве продуктов для синтеза отверждающих агентов и эпоксидных смол / T. Matynia // Polimery. – 1980. – Vol. 25, № 6–7. – P. 227–230.

6. Клюев, А. Ю. Получение и исследование свойств термоотверждаемых лаков / А. Ю. Клюев, Р. Г. Шляшинский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 1996. – № 2. – С. 100–104.

7. Получение и исследование свойств термоотверждаемых лаков / А. Ю. Клюев [и др.] // Новые материалы и технологии «Номатех-96» : тез. докл. II Республ. науч.-техн. конф., Минск, 15–17 мая 1996 г. : ИММС НАН Беларуси. Материалы, технологии, инструменты. – 1996. – Т. 2. – С. 116.

8. Проневич, А. Н. Получение, свойства и применение терпеномалеиновых смол : автореф. дис. … канд. техн. наук : 05.21.03 / А. Н. Проневич ; Бел. гос. техн. ун-т. – Минск, 1999. – 22 с.

9. Вершук, В. И. Методы анализа сырья и продуктов канифольного производства / В. И. Вершук, Н. А. Гурич. – Л. : Гослесбумиздат, 1960. – 190 с.

10. Уэндландт, У. Термические методы анализа / У. Уэндландт. – М.: Мир, 1978. – 526 с.

11. Эмануэль, Н. М. Химическая физика старения и стабилизации полимеров / Н. М. Эмануэль, А. Л. Бучаченко. – М.: Наука, 1982. – 360 с.

12. Broido, A. The graficaly method of treating termografical analisis dates / A. Broido, A. Semple // J. Polym. Sci. – 1969. – Vol. 7, № 10. – P. 1761–1772.

13. Прокопчук, Н. Р. Исследование термостойкости полимеров методом дериватографии / Н. Р. Прокопчук // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 1984. – № 4. – С. 119–121.

14. Прокопчук, Н. Р. Кинетический принцип прогнозирования зависимости механических свойств полимерных волокон и пленок от их химического строения и состава : автореф. дис. … д-ра хим. наук : 01.04.19 / Н. Р. Прокопчук ; ИХВМС АН УССР. – Киев, 1989. – 34 с.

References

1. Nikolaev A. F., *Sinteticheskie polimery i plasticheskie massy na ikh osnove* [Synthetic polymers and plastics based on them], Khimiia, Moscow, RU, 1966.

2. Matynia T., Uniwersytet Marii Curie-Sklodowskiej, *Sposob wytwarzania adduktu Dielsa-Aldera*, PL, Pat. № 125622, 1984.

3. Tadeusz M., Uniwersytet Marii Curie-Sklodowskiej, *Method of obtaining a hardener for epoxy resins*, PL, Pat. № 129726, 1984.

4. Matynia T., "Diels–Alder adducts as epoxy resin hardeners", *Journal of Applied Polymer Science*, 1980, vol. 25, no. 1, pp. 1–13.

5. Matynia T., "Dilsa-Alder's adducts of terpenic hydrocarbons as products for synthesis of the curing agents and epoxies", *Polimery*, 1980, vol. 25, no. 6–7, pp. 227–230.

6. Kliuev A. Iu., Shliashinskii R. G., "Obtaining and investigating the properties of thermoset lacquers", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 1996, no. 2, pp. 100–104.

7. Kliuev A. Iu., "Obtaining and investigating the properties of thermoset lacquers", *Materialy, tekhnologii, instrumenty* [MATERIALS, TECHNOLOGIES, TOOLS], 1996, no. 2, p. 116.

8. Pronevich A. N., "Preparation, properties and application of terpenomalein resins", Abstract of Ph.D. dissertation, Technology and equipment for chemical processing of wood biomass; Wood chemistry, Belarusian State Technological University, Minsk, BY, 1999.

9. Vershuk V. I., Gurich N. A., *Metody analiza syr'ia i produktov kanifol'nogo proizvodstva* [Methods of analysis of raw materials and products of rosin production], Goslesbumizdat, Leningrad, RU, 1960.

10. Wendlandt U., *Termicheskie metody analiza* [Thermal analysis methods], Mir, Moscow, RU, 1978.

11. Emanuel' N. M., Buchachenko A. L., *Khimicheskaia fizika stareniia i stabilizatsii polimerov* [Chemical physics of aging and stabilization of polymers], Nauka, Moscow, RU, 1982.

12. Broido A., Semple A., "The graficaly method of treating termografical analisis dates", *Journal of Polymer Science*, 1969, vol. 7, no. 10, pp. 1761–1772.

13. Prokopchuk N. R., "Investigation of the heat resistance of polymers by the method of derivatography", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 1984, no. 4, pp. 119–121.

14. Prokopchuk N. R., "Kinetic principle of predicting the dependence of the mechanical properties of polymer fibers and films on their chemical structure and composition", Abstract of D. Sc. Dissertation, Physics of Polymers, IHVMS Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev, UA, 1989.

Информация об авторах

Латышевич Ирина Александровна – мл. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irinalatyshevitch@gmail.com.

Прокопчук Николай Романович – член-кор., д-р хим. наук, профессор, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tnsipp@belstu.by.

Клюев Андрей Юрьевич – канд. техн. наук, вед. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: loc@ifoch.bas-net.by.

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.

Information about the authors

Iryna A. Latyishevich – Junior researcher, Institute of Physical Oganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irinalatyshevitch@gmail.com.

Nikolay R. Prokopchuk – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Chemistry), Professor, Belarusian State Technological University (13, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tnsipp@belstu.by.

Andrey Y. Kliuyev – Ph. D. (Engineering) , Senior researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 13, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: loc@ifoch.bas-net.by.

Nikolay G. Kozlov – 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.

ISSN 1561-8331(print.)

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.152.3

Поступила в редакцию 24.01.2017
Received 24.01.2017

Н. М. Литвинко

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ПРИКЛАДНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ ФОСФАТИДАЦИЛГИДРОЛАЗ В ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОСВЯЗИ «СТРУКТУРА – ФУНКЦИЯ» В РЯДУ БИОПОЛИМЕРОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

Аннотация: Представлен обзор основных экспериментальных результатов в области прикладной энзимологии фосфатидацилгидролаз при исследовании взаимосвязи «структура – функция» в процессе фосфолиполиза с участием растворимых (гемоглобин), периферических (цитохром b_5), интегральных (CYP2B4) и якорных (CYP3A4) белков, а также низкомолекулярных биорегуляторов (хлор- и фосфорорганические соединения, производные 1,3-циклогександиона, оксазола, тиотетроновых и жирных кислот). Обсуждены стратегические перспективы развития научных исследований и инновационных технологий в рамках биоорганической химии по направлению прикладная (инженерная) энзимология с участием фосфолиполитических ферментов.

Ключевые слова: фосфолипаза A_2 и фосфолипаза С, фосфолиполиз, физиологически активные соединения

Для цитирования: Литвинко, Н. М. Прикладная энзимология фосфатидацилгидролаз в изучении взаимосвязи «структура–функция» в ряду биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов / Н. М. Литвинко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 115–128.

N. M. Litvinko

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

APPLIED ENZYMOLOGY OF PHOSPHATIDACYLHYDROLASES IN A STUDY OF THE STRUCTURE–FUNCTION RELATIONSHIP IN THE SERIES OF BIOPOLYMERS AND LOW-MOLECULAR BIOREGULATORS

Abstract: Overview of the main experimental results in the field of applied enzymology of phosphatidacylhydrolases in a study of the structure – function relationship in the process of a phospholipolysis including soluble (hemoglobin), peripheral (b_5), integral (CYP2B4) and anchor (CYP3A4) proteins, as well as low-molecular bioregulators (chlorine- and phosphoorganic compounds, derivatives of 1,3-cyclohexanedione, oxazole, the tiotetronic and fatty acids). The strategic prospects of development of scientific research and innovation within bioorganic chemistry at the field of applied (engineering) enzymology involving phospholipolytic enzymes, are discussed.

Keywords: phospholipase A_2 and phospholipase C, phospholipolysis, physiologically active compounds

For citation: Litvinko N. M. Applied enzymology of phosphatidacylhydrolases in a study of the structure–function relationship in the series of biopolymers and low-molecular bioregulators. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 115–128 (In Russian).

Введение. Использование биокатализа в химии – типичный пример «зеленой химии», под которой подразумевают любое усовершенствование химических процессов, которое положительно влияет на окружающую среду.

В настоящее время продукты прикладной (инженерной) энзимологии определяют состояние крупнейших отраслей, таких как фарминдустрия, пищевая, целлюлозно-бумажная, текстильная промышленности и многие другие сектора экономики с миллиардными оборотами, во многом за-

висят от прогресса в области новых биотехнологий на основе ферментов. Ферменты по объему производства занимают 3-е место в мире после аминокислот и антибиотиков. В нашей стране экспорт ферментов составляет 5% от его общего объема. Это направление весьма актуально, поскольку лекарственная и продовольственная безопасность, борьба с террористической угрозой, экологическая и демографическая обстановка в стране, усиление экономического потенциала – все это напрямую связано и обусловлено состоянием дел в отечественной биотехнологии, в том числе и инженерной энзимологии.

Основная часть. Как новая отрасль науки, инженерная энзимология начиналась в 70-х годах прошлого столетия с промышленной энзимологии, являющейся, по сути, основой биотехнологии, с использования в промышленном масштабе иммобилизации ферментов. Как известно, фермент, ковалентно присоединенный («пришитый») к любому органическому или неорганическому полимерному носителю (матрице) называют иммобилизованным [1]. Техника иммобилизации ферментов допускает решение ряда ключевых вопросов энзимологии (рис. 1): обеспечение высокой специфичности действия ферментов и повышения их стабильности, простоту в обращении, возможность повторного использования, применение их в синтетических реакциях в потоке [2]. Применение подобной техники в приложении к промышленности получило название инженерной энзимологии (табл. 1)

Таблица 1. **Иммобилизованные ферменты, используемые в промышленности [4]**

Table 1. **Immobilized enzymes used in industry [4]**

Иммобилизованный фермент	Объемы выпуска, т/г	Получаемый продукт	Страна
Аминоацилаза	< 5	L-аминокислоты	Япония
Аминоглюкозидаза	1	Глюкоза	Англия
Глюкозоизомераза	1500–1750	Глюкозо-фруктозные сиропы	Дания, Нидерланды, Япония
Гидантоиназа	< 1	D-фенилглицин	Япония
Лактаза	5	Лактозные гидролизаты	Япония
Нитрилаза	0,1	Акриламид	Япония
Пенициллин G-ацилаза	3–4	6 АПК	Япония, Нидерланды
Пенициллин V-ацилаза	1	6 АПК	Англия, Австрия

С использованием биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов в исследованиях в области сэндвичевых соединений, положивших основу для изобретения биокатализаторов, улучшающих свойства низкокачественных бензинов, была Джефри Уилкинсоном и Эрнстом Фишером разработана технология с применением биокатализатора *MPG* – Нобелевского лауреата 1973 года [3], которая позволяет увеличить пройденное автомобилем расстояние на том же количестве топлива, при этом повышается КПД двигателя (рис. 2).

За прошедшие 4,5 десятилетия ареал исследований в области инженерной энзимологии значительно расширился. Современная инженерная энзимология – это перспективное научно-техническое направление, которое объединяет фундаментальные и прикладные научные исследования по достаточно широкому спектру работ, охватывающему изучение структурно-функциональных особенностей биокатализа [5, 6], выделение ферментов из биологических объектов; иммобилизацию, в том числе включение в мицеллы, и их влияние на ферментативную активность [7, 8]; липосомы и их использование [9]; ферменты в экстремальных условиях; конструирование биокатализаторов и их использование в биотехнологии [10]; использование ферментов в тонком химическом синтезе; медицинская энзимология (энзимодиагностика, энзимотерапия) [11, 12]; иммуноферментный анализ – основные принципы, виды и их отличительные характеристики [13]; утилизация промышленных отходов с помощью ферментов; создание биоэлектрохимических преобразователей энергии с использованием ферментов; индустриальный биокатализ; получение биотоплив и др.

Анализ результатов деятельности Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси показывает, что работы его сотрудников в области инженерной энзимологии

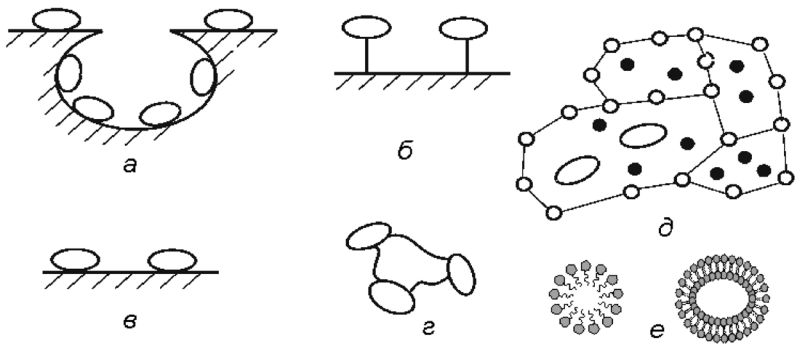


Рис. 1. Основные методы иммобилизации ферментов: *а* – абсорбция на крупнопористом носителе; *б* – ковалентное связывание; *в* – адсорбция; *г* – поперечная сшивка; *д* – включение в гель; *е* – включение в мицеллы и липосомы

Fig. 1. Main methods of enzyme immobilization: *а* – absorption on a coarse-pore carrier; *б* – covalent bonding; *в* – adsorption; *г* – cross-linking; *д* – incorporation in gel ; *е* – incorporation in micelles and liposomes

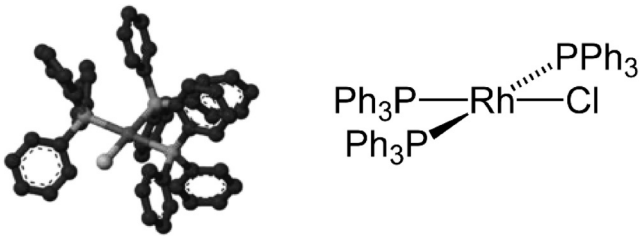


Рис. 2. Катализатор Уилкинсона [3]

Fig. 2. Wilkinson catalyst [3]

являются определяющими для становления биоорганической химии (рис. 3). Каждая лаборатория внесла определенный вклад в развитие соответствующего направления инженерной энзимологии:

1) выделение ферментов в высокочистом состоянии, например, цитохром Р450, фосфолипаза A_2 (ФЛА$_2$), фосфолипаза С (ФИ-ФЛС), тиропероксидаза (ТПО), цитохром b_5 [14–16];

2) иммобилизация – адсорбционная, ковалентная, в агарозном геле, включение в липосомы и обращенные мицеллы, жидко- и твердофазная (ФЛА$_2$, пероксидаза, каталаза, уреаза и др.) [17];

3) структурно-функциональные особенности биокатализа, определение первичной и пространственной структуры (ЦР450), механизмов действия (ЦР450, ФЛА$_2$, пероксидаза, ТПО и др.) [18–21];

4) иммунохимия, иммуноферментный микроанализ. Маркеры антигенов и антител в ИФА (пероксидаза хрена, каталаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, конъюгаты ферментов с антигенами и антителами против них, ТПО) [22–24];

5) ферменты, используемые в тонком органическом синтезе: нуклеозидов (ДНК и РНК-полимеразы, нуклеозидкиназы и др.) [25], липидов (ФЛА$_2$, ФЛD);

6) липосомы – как контейнеры для лекарств (например, инсулина, конъюгаты с противоопухолевыми нуклеозидами), стабильность к ферментной деградации липосом и протеолипосом (ФЛА$_2$) [26, 27];

7) иммунотоксины (барназа) – для энзимодиагностики, энзимотерапии медицинской энзимологии [28–30];

8) белковая инженерия для целенаправленного множественного практического использования – рекомбинантные белки семейства ЦР450, ТПО [31].

Нами в результате комплексного исследования фосфолиполиза с участием растворимых (гемоглобин), периферических (цитохром b_5), интегральных (CYP2B4) и якорных (цитохром С и CYP3A4) белков, а также низкомолекулярных биорегуляторов (хлор- и фосфорорганические соединения, производные 1,3-циклогександиона, оксазола, тиотетроновых и жирных кислот) нако-

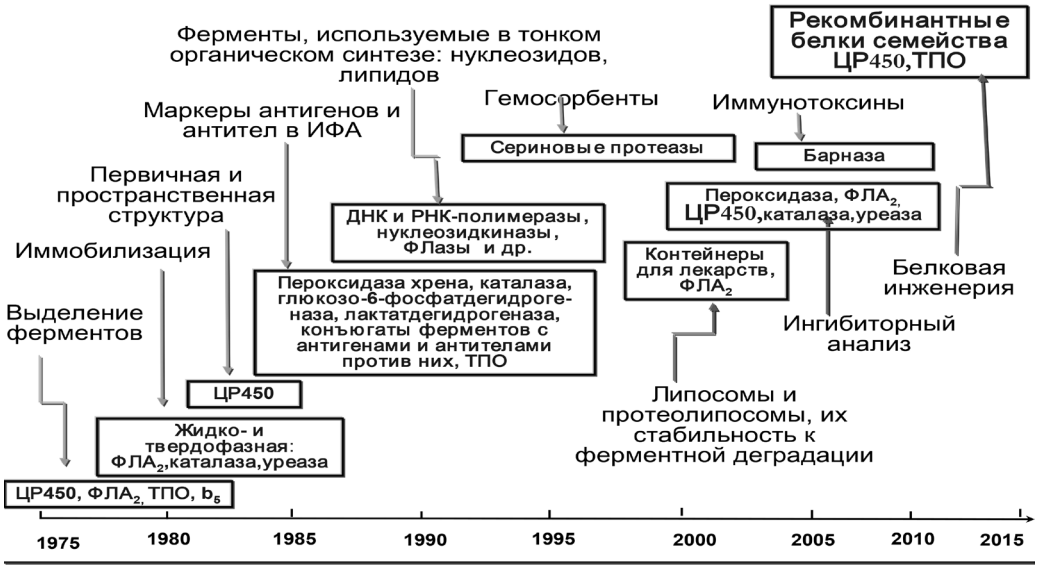


Рис. 3. Этапы становления инженерной энзимологии в Институте биоорганической химии НАН Беларуси

Fig. 3. Stages of the formation of engineering enzymology at the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus

плен определенный опыт в решении проблем ряда разделов инженерной энзимологии фосфатидацилгидролаз ($ФЛА_2$, ФЛС, ФЛD):

– изучены физико-химические свойства 10 катализаторов фосфолиполиза (6 разных $ФЛА_2$ – ядов трех змей и пчелы, панкреаса свиньи, человека; 3 микробных ФЛС и 1 ФЛD из капусты) в ряду природных и полусинтетических фосфолипидов: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилэтанола, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, кардиолипина как в индивидуальном состоянии, так и в различных сочетаниях, в том числе в смеси со сфингомиелином, негидролизуемом этими ферментами [32];

– выделены в высокоочищенном состоянии $ФЛА_2$ панкреаса свиньи [33, 34];

– проведен теоретический анализ первичных структур разных функциональных видов фосфолипаз $А_2$ [35];

– уточнена топография активного центра $ФЛА_2$ и ФЛС [36, 37];

– впервые получены антитела к ФЛА-зам ($ФЛА_2$ – ядов гадюки, гюрзы и кобры, панкреаса свиньи, пчелы, ФЛС *Clostridium perfringens*) и протеиназам (трипсина и химотрипсина) и охарактеризованы иммунохимические свойства поверхности глобулы этих белков [38];

– выявлены основные свойства межфазной поверхности, играющие определяющую роль в катализе фосфолиполитических реакций: заряд > супрамолекулярная организация > структурная упорядоченность фосфолипидов в мембране > химическое строение [32];

– проведен на кинетическом уровне поиск ингибиторов и активаторов $ФЛА_2$ кобры и панкреаса свиньи [39];

– установлена *in vitro* прямая и опосредованная взаимосвязь фосфолиполиза с функционированием двух изоферментов монооксигеназного катализа (CYP2B4 и CYP3A4) [40];

– охарактеризована стабильность липосом и протеолипосом с включением якорных и периферических белков к ферментной деградации [32] (рис. 4) и др.

Нами разработан новый системный подход к изучению стабильности $ФЛА_2$ и ФЛС по отношению к разным фосфолипидам (цвиттер-ионным, анионным) с использованием в комплексе в одинаковых условиях целенаправленно модифицированных модельных липидных мембран (по заряду, супрамолекулярной организации, структурной упорядоченности, физическому состоянию, по составу с включением интегральных, «якорных», периферических белков), при воздействии внутренних (этанол, лизолипиды, жирные кислоты и их амиды, нуклеозиды и их производные, в том числе конъюгаты с ФЭ) и внешних (радиационное воздействие, УФ-облучение, пестициды) факторов [32] (рис. 4).

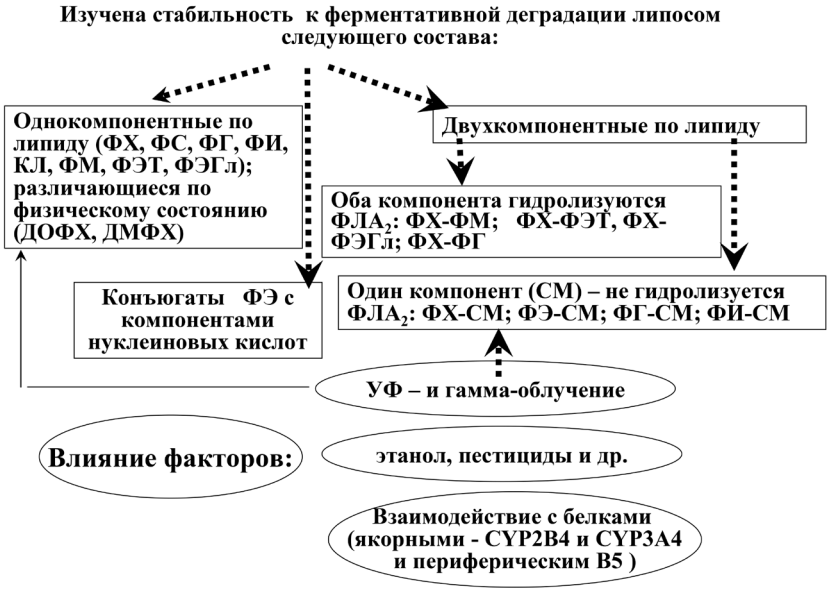


Рис. 4. Схема системного подхода исследования стабильности к ферментативной деградации липосом как потенциальных контейнеров лекарств различного фосфолипидного состава – фосфатидил: -холин (ФХ), -серин (ФС), -глицерин (ФГ), - инозит (ФИ), -метанол (ФМ), -этанол (ФЭТ), -этаноламин (ФЭ), -этиленгликоль (ФЭГл), диолеоилфосфатидилхолин (ДОФХ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), кардиолипин (Кл), сфингомиелин (СМ)

Fig. 4. Scheme of the systematic approach to the research of stability to enzymatic degradation of liposomes with different phospolipid composition , as a potential drug carriers – phosphatidyl: -choline (ФХ), -serine (ФС), -glycerol (ФГ), -inositol, methanol (ФМ), -ethanol (ФЭТ), -ethanolamine (ФЭ), -ethylene glycol (ФЭГл), dioleoylphosphatidylcholine (ДОФХ), dimyristoylphosphatidylcholine (ДМФХ), cardiolipin (Кл), sphingomyelin (СМ)

При изучении устоичивости к действию $ФЛА_2$ глицерофосфолипидов в составе одно- и двухкомпонентных липосом обнаружен стимулирующий деградацию цвиттер-ионного ФХ эффект анионных фосфолипидов ФМ, ФЭТ, ФЭГл в двухкомпонентных липосомах (соотношение 1:3 моль/моль). Усиленный гидролиз цвиттер-ионного ФХ в зависимости от доли ФЭТ наблюдается в пределах содержания последнего в смеси от 40 до 80 мол.%. Изменения гидролиза ФЭТ незначительны.

Поскольку этанол нарушает упорядоченность липидного бислоя, в его присутствии скорость гидролиза ДОФХ в двухкомпонентных липосомах по сравнению со скоростью его гидролиза в однокомпонентных в отсутствие спирта возрастает в 2–3,5 раза в зависимости от концентрации этанола. Наиболее усточивыми к ферментативному разрушению оказались фосфолипиды в составе двухкомпонентных липосом со сфингомиелином. По скорости ферментативного расщепления наблюдается следующий ряд: ФИ = ФЭ > ФХ > ФГ. Степень гидролиза ДОФХ снижалась в начальный период реакции (до 10 мин) практически вдвое в эквимолярной смеси с ДОФГ.

Результаты исследования межфазного катализа липолитических реакций с использованием фосфолипаз привели к важнейшим фундаментальным выводам:

наличие в молекуле фермента ранее необнаруженного анионного участка (сайта) для взаимодействия фермента с межфазной поверхностью [41]; участие цитидинсодержащих нуклеозидов в фосфолиполизе [42]; механизм действия фосфолипаз по типу «сериновых катализаторов» и их общий с протеазами эволюционный предшественник [35]; первичная регуляция каталитической способности фосфолипаз на надмолекулярном уровне зависит в большей степени от супрамолекулярной организации межфазной поверхности, ее структурной упорядоченности и заряда при второстепенной роли химического строения субстрата [43]; утрата абсолютной специфичности ФИ-ФЛС при изменении заряда межфазной поверхности [44]; изменение поверхностной специфичности фермента поджелудочной железы и приобретение несвойственной ему способности разрушать целостные клеточные мембраны в присутствии некоторых 1,3-циклогександионов [45] и др.

Проведенные исследования привели к разработке комплекса оригинальных методов выделения фосфолипазы $А_2$ из биологического материала путем жидкофазной аффинной сорбции с применением обращенных мицелл лецитина в толуоле [46]; определения активности фосфоли-

пазы A_2 с использованием ТСХ для разделения продуктов гидролиза [47] и технологии разностной спектрофотометрии [48]; определения общей антиоксидантной способности биологической жидкости с использованием липидной фазы [49]; определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови [50] и других нетривиальных приемов и способов.

Установлены различные механизмы катализа (прямой, опосредованной и обратной связи) в присутствии ряда низкомолекулярных биорегуляторов: лизолипидов, жирных кислот и их амидов, производных простангландинов, циклогександионов с пестицидной активностью, производных нуклеозидов с противоопухолевой и противовирусной активностью [51]. Обнаружены неизвестные ранее ингибиторы фосфолиполиза среди физиологически активных соединений: амидов жирных кислот, 9-*Me*, 10-*Me*, 11-*Me* аналогов простагландинов, производных тиотетроновой кислоты, производных оксазола, 1,3-циклогександионов, фосфодиэфирных производных ацикловира и аденозина (табл. 2). Из табл. 2 следует, что исследованные низкомолекулярные биорегуляторы, оказавшие наибольший эффект на функцию фостатидацилгидролаз, имеют в своей структуре циклический фрагмент.

Таблица 2. **Основные ксенобиотики, оказавшие наибольший эффект при изучении ФЛА$_2$**

Table 2. **Basic xenobiotics with the greates influence on the study of PLA$_2$**

№ п/п	Соединение	Эффект
I. Хлорорганические арилсодержащие соединения		
1	Пропиканозол, 1-[2-(2,4-дихлорфенил)-[1,3]диоксолан-2-илметил]-1H-[1,2,4]-триазол	1–S/S_0, –0,076±0,01
2	Циперметрин, (R,S)-α-циано-3-феноксибензил (1RS)-цис-транс-3-(2,2-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоксилат	1–S/S_0, –0,022±0,01
3	Хизалофоп-П-этил, (R)-2-[4-(6-хлорхиноксалин-2-изокси)фенокси]пропионовой кислоты этиловый эфир	IC_{50} = 0,013 мМ
II. Фосфорорганические соединения		
4	Глифосат, N(фосфонометил)-глицин	тип ингибирования – конкурентный: увеличение K_m; снижение K_S, $V_{max} = V_{maxi}$ K_i = 23,5 мМ, IC_{50} = 3 мМ
5	Фосфорной кислоты 2-(2-амино-6-оксо-3,6-дигидро-пурин-9-илметокси)-этиловый эфир 2-(4-нитрофенил)-этиловый эфир, фосфодиэфирное производное ацикловира	S/S_0, ЛК, ингибирование,38±5 %; *M,* ФХ: ДХ-*Na,* тип ингибирования конкурентный: увеличение K_m; снижение K_S, $V_{max} = V_{maxi}$, K_i = 0,15 мМ IC_{50} = 100 мкМ
6	Бензойной кислоты 5-(6-бензоиламинопурин-9-ил)-4-{гидрокси-[2-(4-нитрофенил) этокси]-фосфорилокси}-2-[(2-метоксифенил)-дифенилметоксиметил]-тетрагидрофуран-3-иловый эфир	S/S_0, ЛК, ингибирование 36±5 % *M,* ФХ: ДХ-*Na,*тип ингибирования конкурентный: увеличение K_m; снижение K_S, $V_{max} = V_{maxi}$, K_i = 0,1 мМ, IC_{50} = 50 мкМ;
7	Ацикловирмонофосфат	S/S_0, ЛК – активирование 15 %, М, ФХ: ДОХ, активирование в 1,1 раза
8	Ацикловиртрифосфат	S/S_0, ЛК – активирование 38 % М, ФХ:ДОХ, активирование в 1,15 раза
9	Аденозин монофосфат	S/S_0, ЛК – активирование 5 % М, ФХ: ДОХ ингибирование 40 % (50 мкМ), активация 15 % (0,5 мкМ) Л – не влияет
10	Аденозиндифосфат	S/S_0, ЛК – активирование 5 % М, ФХ:ДОХ, ингибирование 30 % (50 мкМ), не влияет (0,5 мкМ) Л – ингибирование до 40 %
11	Аденозинтрифосфат	S/S_0, ЛК – активирование 15 %; М, ФХ:ДОХ, ингибирование 40 % (50 мкМ), активация 20 % (0,5 мкМ) Л – не влияет

Продолжение табл. 2

№ п/п	Соединение	Эффект
12	Циклический аденозинмонофосфат, переносчик гормонального сигнала внутрь клетки	S/S_0, ЛК – активирование в 1,3 раза, М, ФХ:ДОХ, ингибирование (50 мкМ) 80 % (2 мин) далее не влияет; Л – ингибирование 40 %
13	Гуанозинмонофосфат	S/S_0, ЛК – активирование на 15 %
14	Цитозинмонофосфат	S/S_0, ЛК – активирование в 1,7 Л – ингибирование 80 % (до 2 мин)
15	Фосфолипидное производное ацикловира	Л – скорость гидролиза снижена в 3 раза по сравнению с ФЭА
III. Производные 1,3-циклогександиона		
16	2-пропионил-5-(2,4,6-триметил-фенил)-циклогексан-1,3-дион	ЛК, 1-S/S_0, 0,38±0,01; *M*, тип ингибирования – сопрягающий (бесконкурентный): $V_{max} > V_{maxi}$, снижение K_m, увеличение K_S, K_i = 5,3 мМ
17	Тралкоксидим, 2-(1-этоксиимино-пропил)-5-(2,4,6-триметил-фенил)-циклогексан-1,3-дион	1-S/S_0, 0,21± 0,02; *M*, тип ингибирования – сопрягающий (бесконкурентный): $V_{max} > V_{maxi}$, снижение K_m, увеличение K_S, K_i = 6,25 мМ
18	2-(цис,цис-9,12-октадекадиеноил)-циклогексан-1,3-дион	ЛК, 1-S/S_0, 0,323±0,02 *M*, тип ингибирования – сопрягающий (бесконкурентный): $V_{max} > V_{maxi}$, снижение K_m, увеличение K_S, K_i = 4 мМ
IV. Производные оксазола		
19	19. 6-(2-(этилтио)пропил)-2-пропил-6,7-дигидро-1,3-бензоксазол-4(5*H*)-он	ЛК,1-S/S_0, –0,061±0,02
20	2-этил-6-(2,4,6-триметил-фенил)-6,7-дигидро-5Н-бензоксозол-4-он О-этилоксим	ЛК,1-S/S_0, 0,28±0,01
21	2-этил-6-(2,4,6-триметил-фенил)-6,7-дигидро-5Н-бензоксозол-4-он	ЛК,1-S/S_0, 0,30±0,01
V. Производные тиотетроновых кислот		
22	5-[(Z)-фенилметилиден]-3-[(E)-3-фенил-2-пропеноил]-2,4(3*H*,5*H*)тиофендион	ЛК, S/S_0, (%): 75,7±5,0 – $ФЛА_п$; 102,9±6,4 – $ФЛА_з$; М: ФХ с тритоном Х-100, скорость реакции снижена на 2,7 %, М: ФХ с ДОХ, скорость реакции снижена на 79,9 %; тип ингибирования $ФЛА_п$ – конкурентный: увеличение K_m; снижение K_S, $V_{max} = V_{maxi}$
23	5-бензил-3-[(3-фенил)пропаноил]-2,4(3Н,5Н)-тиофендион	ЛК, S/S_0, (%),85,0±2,0 $ФЛА_п$; 145,0±7,0 $ФЛА_з$ М: ФХ с тритоном Х-100, скорость реакции снижена на, 7,3 %; М: ФХ с ДОХ, скорость реакции снижена на 50 %
24	5-[(E)-2-фурилметилиден]-3-[(E)-3-(2-фурил)-2-пропеноил]-2,4-(3Н,5Н)-тиофендион	ЛК, S/S_0, (%):97,2±2,4 $ФЛА_п$; 102,9±6,4 – $ФЛА_з$; М: ФХ с ДОХ, скорость реакции снижена на 1,6 %, тип ингибирования – конкурентный: $V_{max} = V_{maxi}$ совпадают, увеличение K_m, снижение K_S
25	…6-{[1-(5-бензил-2,4-диоксотетрагидро-3-тиофенилиден)-3-(3-хлорофенил)пропил]амино} гексановая кислота	ЛК, S/S_0, (%):82,0±2,4 $ФЛА_п$,94,0±4,5 $ФЛА_з$ М: ФХ с тритоном Х-100,скорость реакции снижена на 14 %, М: ФХ с ДОХ, скорость реакции снижена на 10 %

Примечания: форма супрамолекулярный организации субстрата (фосфатидилхолин, ФХ): ЛК – липопротеиновый комплекс яичного желтка; М – смешанные мицеллы с тритоном Х-100 или дезоксихолатом натрия, ДОХ; Л – липосомы.

S/S_0 – отношение площади зоны просветления вокруг места нанесения фермента при его диффузии в агарозном геле, содержащем ЛК, в присутствии эффектора и без него.

В 70-х годах прошлого столетия в области изучения фосфолиполиза был известен только класс секреторных фосфолипаз, выделяемых железами внутренней или внешней секреции – панкреаса млекопитающих, ядовитых желез змей, пчел ($ФЛА_2$), деятельности микроорганизмов (ФЛС), растительных клеток ФЛD. Последующее развитие исследований химии фосфолипаз показало важнейшую роль этих ферментов в регуляции биохимических процессов в клетке: от участия в клеточном ответе на стимул при активации любой сигнальной молекулой рецептора G-белка и открывание кальциевых каналов через продукты фосфолиполиза до апоптоза путем действия фактора некроза опухоли на соответствующий рецептор и последующей передачи посредством продуктов липолитических реакций, являющихся вторичными мессенджерами [35].

Сейчас открыты 14 классов только $ФЛА_2$, у млекопитающих – 13 подтипов $ФЛА_1$, 13 подтипов ФИ-ФЛС, два изофермента ФЛД. Представителей практически всех фосфолипаз мы исследовали, кроме $ФЛА_1$. В монографии, посвященной описанию активности фосфолипаз в норме и при патологии [52], проведен детальный анализ их функции и показано, что фосфолипазы – маркеры социально опасных заболеваний (рис. 5). Например, на сегодняшний день ЛП-$ФЛА_2$ рассматривается как важный сердечно-сосудистый маркер, независимый от традиционных факторов риска и независимый предиктор риска развития ишемической болезни сердца.

На основе данных исследований с привлечением нескольких тысяч международных экспертов по предсказанию наиболее перспективных научных направлений в ближайшей и среднесрочной перспективе [53], по нашему мнению, в области прикладной энзимологии следует выделить 10 наиболее важных задач.

1. Разработка биокатализаторов (оксидоредуктазы, лигазы, синтазы и др.), используемых для создания сенсорных устройств, в процессах тонкого органического синтеза, для получения синтонов и т. д.

2. Разработка новых методов выделения и очистки биокатализаторов, их иммобилизации и стабилизации, использования в нетрадиционных и неводных средах.

3. Исследование пространственной структуры биокатализаторов физико-химическими методами (рентгеноструктурный анализ, ядерно-магнитный резонанс и др.) и компьютерного моделирования.

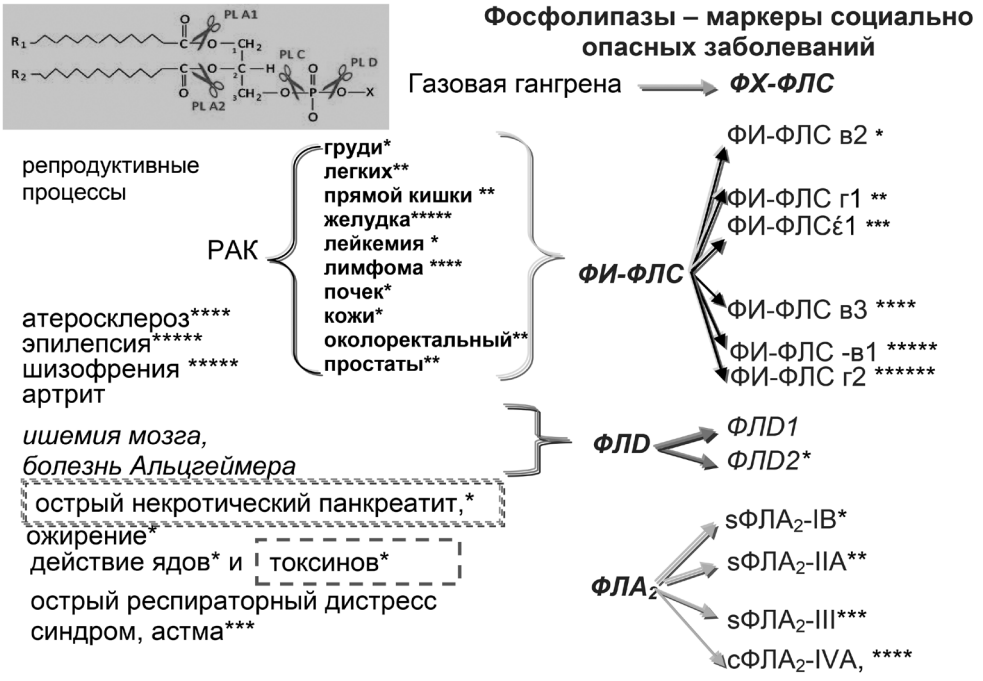


Рис. 5. Проблемы, требующие решения в результате изучения фосфолиполиза. Двойным пунктиром обозначен наш текущий интерес, одинарным – перспектива

Fig. 5. Problems to be solved during the study of phospholipolisys. Double dotted line denotes our current interest, single dotted line – perspective

4. Перспективные ферменты для использования в биокаталитических процессах, в том числе устойчивые к экстремальным условиям реальных биотехнологических процессов (высокой температуре, кислотности или щелочности, присутствию солей, органических растворителей и т. д.).

5. Исследование механизмов биокатализа, выявление физико-химических закономерностей, лежащих в основе ускорения химических реакций биокатализаторами.

6. Разработка искусственных катализаторов, использующих принципы биокатализа.

7. Создание рекомбинантных ферментов с улучшенными технологическими свойствами, в том числе осуществляющих несколько последовательных реакций.

8. Создание научно-технологической базы по биокаталитическим процессам получения соединений, востребованных в различных отраслях промышленности.

9. Создание готовых форм ферментных препаратов для последующего применения в различных областях промышленности.

10. Новые верифицированные методики биотестирования и биоиндикации на основе ферментов: выявление новых тест-объектов биомониторинга и биотестирования; создание и внедрение эффективных биотест-систем, в том числе экспрессных, на основе биологического материала и живых организмов.

На основе имеющихся разработок в области изучения фосфолиполиза наиболее актуальными и практически значимыми для исследования являются следующие задачи: применение природных катализаторов фосфолиполиза в синтезе и при анализе чувствительности к ферментативной деградации производных липидов и их конъюгатов с нуклеозидами; фундаментальные исследования белок-белкового взаимодействия: ФЛАазы – CYP450 и ФЛАазы – *Hb*, а также исследование взаимодействия ФЛАазы с ксенобиотиками в ряду антибиотиков, стероидов, пептидов и др.; продолжение скрининга биологического действия физиологически активных соединений с потенциальным антигемолитическим действием на основе использования $ФЛА_2$ змеи, с антипанкреатитным действием $ФЛА_2$ панкреаса; предварительный скрининг биобезопасности средств защиты растений с использованием разработанной тест-системы, состоящей из 4 тест-контролей; разработка тест-системы по определению общей антиоксидантной способности биологических жидкостей с использованием липидной фазы, например для тестирования не только крови при конкретных патологиях, но и соков и других пищевых продуктов; модификация оригинальной тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта на основе определения общей активности фосфолипазы A_2 [54], а также совсем нового направления изучения токсичности бактериальных фосфолипаз A_2 и разработка методики тест-системы на основе использования фосфолипаз A_2 в качестве бактерицидных агентов, как новых средств борьбы с инфекционными заболеваниями, вызванными патогенными микроорганизмами.

Заключение. Следует отметить, что успехи в развитии отечественной прикладной энзимологии в области исследования ЦР450 отмечены Межгосударственной премией ГДР и СССР 1988 года (А. А. Ахрем, В. Л. Чащин, В. М. Шкуматов, С. А. Усанов, К. Рукпауль, Х. Райн, Г.-Р. Ениг и Г. Сметан); в области химико-энзиматической модификации компонентов нуклеиновых кислот и биохимического моделирования – Государственной премией Республики Беларусь 2004 года (Е. Н. Калиниченко, Н. М. Литвинко, И. А. Михайлопуло, Г. В. Зайцева, А. И. Зинченко, П. Т. Петров); в области мультиферментного каскадного превращения углеводов в нуклеазиды – Межгосударственной премией Российской академии наук и Национальной академии наук Беларуси 2015 года (В. А. Степченко, Ю. А. Соколов, И. А. Михайлопуло). Представленные в этом обзоре данные показывают имеющийся значительный потенциал в изучении важнейших практически значимых аспектов прикладной энзимологии в области фосфолиполиза на основе углубленных исследований взаимосвязи «структура – функция» в условиях воздействия внутренних и внешних факторов от ксенобиотиков до ультафиолетового облучения и радиации.

Благодарности. Автор выносит благодарность всем коллегам, участвовавшим в выполнении перечисленных выше исследований. Исследования в области изучения взаимосвязи «структура–функция» липолитических ферментов в процессе фосфолиполиза были поддержаны грантами Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б01-063, Б04-228, Б04М-164, Х07-181, 07М-188, Х10-096.

Acknowledgements. Author is thankful to all the colleagues who participated in the implementation of the studies listed above. Studies considering the structure-function relationship of lipolytic enzymes in the process of phospholipolysis were supported by grants of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research Б01-063, Б04-228, Б04М-164, Х07-181, 07М-188, Х10-096.

Список использованных источников

1. Иммобилизованные клетки и ферменты / ред. Дж. Вудворд. – М.: Мир, 1988 – 215 с.

2. Buchholz, K. Reaction engineering parameters of immobilized biocatalysis. In: Advanced in biochemical engineering. / Fiechter A. (ed.). – Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1982. – Vol. 24. – P. 39–41.

3. The Preparation and Properties of Tris(triphenylphosphine)halogenorhodium(I) and Some Reactions Thereof Including Catalytic Homogeneous Hydrogenation of Olefins and Acetylenes and Their Derivatives / J. A Osborn [et al.] // Journal of the Chemical Society A. – 1966. – P. 1711–1732.

4. Poulsen, P. B. Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes / P. B. Poulsen. // Biotechnol. Genet.Eng.Reviews. – 1984. – Vol. 1. – P. 121–140.

5. Effect of ultrasound as a new method of studying conformational transitions in enzyme active-sites - pH-induced and temperature-induced conformational transitions in active-center of penicillin amidase / I. V. Berezin [et al.] // FEBS Letters, Elsevier BV (Netherlands). –1975. – Т. 49, № 3. – С. 325–328.

6. Молекулярный полиморфизм ферментов человека – основа индивидуальной чувствительности к лекарствам. Суперкомпьютерное моделирование как метод анализа структурных изменений белка и его каталитической активности / С. Д. Варфоломеев [и др.] // Изв. АН СССР. Сер. хим. – 2016. – № 6. – С. 1592–1607.

7. Micellar enzymology – superactivity of enzymes in reversed micelles of surfactants solvated by water organic cosolvent mixtures / N. L. Klyachko [et al.] // Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 1992. – Vol. 57, N. 3. – P. 625–640.

8. Matrix design for bacteriolytic enzyme encapsulation / N. L. Klyachko [et al.] // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2006. – Vol. 16, N 4. – P. 293–299.

9. Influence of the lipid composition on the catalytic activity of acid phosphatase in reverse micelles / У. В. Кудряшова [и др.] // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 3.–С. 420–428.

10. Стабилизация щелочной протеиназы и целлюлаз комплексообразованием с хитозаном для применения в составе синтетических моющих средств / Е. В. Кудряшова [и др.] // Биоорг. химия. – 2009. – Т. 35, № 3. – С. 1–8.

11. Early diagnosis of lung cancer based on proteome analysis of exhaled breath condensate / K. U. Fedorchenko [et al.] // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2016. – Vol. 71, N 2. – P. 134–139.

12. Proteomic analysis of exhaled breath condensate for diagnostics of respiratory system diseases / A. S. Kononikhin, K. Y. Fedorchenko, A. M. Ryabokon [et al.] //Biochemistry, Supplemental Series B. – 2016. – Vol. 10, N 3. – P. 230–234.

13. Флуоресцентный иммуноанализ. Синтез, спектрально-флуоресцентные и иммунологические свойства конъюгатов корпропорфирина 1 с антителами / Д. Б. Папковский [и др.] // Прикл. биохим. и микробиол. – 1989. – Т. 25, № 4. – С. 548–557.

14. Isolation, structural organization and mechanism of action of mitochondrial steroid hydroxylating systems / A. A. Akhrem [et al.] // Acta biol. med. Germ. – 1979. – Vol. 38, N 2–3. – P. 257–273.

15. Influence of the charge and organization of the substrate on the activity of phosphatidylinositol-specific phospholipase C / A. A. Akhrem [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 1984. – Vol. 49, N 3.– P. 317–321.

16. Характеристика иммуноаффинной хроматографии и новый метод получения тиропероксидазы человека из субклеточных фракций щитовидной железы / О. В. Цыганова [и др.] // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. Т. 42, № 2. – С. 236–246.

17. Обращенные мицеллы ПАВ в органических растворителях – модель биологических мембран. / Д. И. Метелица, А. Н. Еремин // Успехи биол. химии. –1988. – Т. 28. – С. 145–173.

18. Метелица, Д. И, Активация кислорода ферментными системами / Д. И. Метелица. – М.: Наука, 1982. – 255 с.

19. Метелица, Д. И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов / Д. И. Метелица. – Минск: Наука и техника, 1984. – 293 с.

20. Study of lipolysis in model membranes in the presence of positively charged soluble proteins / M. K. Naubatova [et al.] // Biochemistry (Moscow), 1992. – Vol. 57, N 4. – P. 411–416.

21. Structural Insights into Aldosterone Syntase Substrate Specificity and Targeting Inhibition / N. Strushkevich [et al.] // Mol. Endocrinol. – 2013. – Vol. 27, N 2. – P. 315–324.

22. Метелица, Д. И. Активация кислорода ферментными системами – цитохромом Р-450 и другими гемопротеинами / Д. И. Метелица // Успехи химии. – 1982. – Т. 51, № 11. – С. 1819–1848.

23. Catalytic activity and thermostability of dehydrogenase conjugates with cortisol and progesterone / D. I. Metelitsa [et al.] // Bioconjugate Chemistry. – 1991. – Vol. 2, iss. 5. – P. 309–316.

24. Иммунохимический анализ фосфолипаз A_2 и фосфолипазы С *Clostridium perfringens* / А. А. Ахрем [и др.] // Изв. АН БССР. Сер. хим. – 1977. № 5. – С. 113–118.

25. Recognition of Artificial Nucleobases by *E. coli* Purine Nucleoside Phosphorylase versus its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base-Modified Nucleosides. Chem. / Fateev I. V. [et al.] // A Eur. J. – 2015. – Vol. 21. – P. 13401–13419.

26. Study of stability of liposomes, potential drug carriers, to the action of phospholipase A_2 / N. M. Litvinko [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 1993. – Vol. 29, N 3. – P. 361–366.

27. Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: Studies in the rat / M. A. Kisel [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2001. – Vol. 216, N 1–2. – P. 105–114.

28. Рекомбинантный иммунотоксин scFv4D5-барназа, специфичный к с-ErbB2-позитивным клеткам рака молочной железы: фолдинг, стабильность, цитотоксическая активность / А. П. Власов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2009. – № 1. – С. 5–13.

29. Метелица, Д. И. Инициирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидных системах / Д. И. Метелица, Е. И. Карасёва // Прикл. биохим. и микробиол. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 537–564.

30. Высокоэффективные тест-системы оценки общей антиоксидантной активности биологических жидкостей человека / Д. И. Метелица [и др.] // Труды БГУ. –2008. – Т. 3. Ч. 1. – С. 7–21.

31. Evidence That Compound I Is the Active Species in Both the Hydroxylase and Lyase Steps by Which P450scc Converts Cholesterol to Pregnenolone:EPR/ENDOR/Cryoreduction / Annealing Studies / R. Davydov [et al.] // Biochemistry. – 2015. – Vol. 54. – P. 7089–7097.

32. Литвинко, Н. М. Активность фосфолипазы A_2 и С при биохимическом моделировании / Н. М. Литвинко. – Минск: Технопринт, 2003. – 350 с.

33. Способ выделения фосфолипазы A_2: пат. 8416 Республики Беларусь: МПК7 C12N 9/16 (2006)/Н.М. Литвинко; дата публ.: 30.08.2006.

34. Separation and purification of isoenzymes of phospholipase C of Clostridium perfringens / G. F Shemanova [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. –1978. – Vol. 14, N 3. – P. 314–318.

35. Литвинко, Н. М. Эндогенные фосфолипазы A_2 / Н.М. Литвинко, М. А. Кисель. – Минск: Наука и техника, 1991. – 270 с.

36. Litvinko, N. M. Anionic center of pancreatic phospholipase A_2 / N. M. Litvinko, Yu. I. Khurgin, E. D. Kaverzneva // Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science. – 1976. – Vol. 25, N 7. – P. 1586.

37. Litvinko, N. M. Effect of low-molecular-weight substrate fragments and their analogs on activity of isoenzymes of phospholipase C from Clostridium perfringens of type A / N. M. Litvinko, Yu. I. Khurgin, G. F. Shemanova // Biochemistry (Moscow). – 1977. – Vol. 42, N 6 (II). – P. 838–842.

38. Получение антител к гидролитическим ферментам и выявление их в реакции пассивной гемагглютинации / Г. Ф. Шеманова [и др.] // Иммунология. – 1981. – № 1. – С. 43–46.

39. Литвинко, Н. М. Ингибирование фосфолипаз A_2 и С / Н. М. Литвинко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2005. – № 4. – С. 113–124.

40. Антончик, Г. Н. Исследование белок-белкового взаимодействия цитохрома Р-450 и фосфолипазы A_2 / Г. Н. Антончик, Т. Г. Гудко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2015. – № 1. – С. 3–5.

41. Litvinko, N. M. The anionic site of hog pancreatic phospholipase A_2 / N. M. Litvinko, Yu. I. Khurgin, E. D. Kaverzneva // Biochemistry (Moscow). – 1977. – Vol. 42, N 1(I). – P. 68–75.

42. Litvinko, N. M. Formation of phospholipase A_2 complexes with nucleic acid fragments and methods for their disruption / N. M. Litvinko, A. P. Drozhdeniuk //Applied Biochemistry and Microbiology. – 1996. – Vol. 32, N 6. – P. 585–589.

43. Litvinko, N. M. Dynamics of formation of lysoforms on enzymatic hydrolysis of phosphatidylalkanols / N. M. Litvinko, S. V. Kuchuro, M. V. Zhukova // Biochemistry (Moscow). – 2002. – Vol. 67, N 9. – P. 1027–1031.

44. Litvinko, N. M. Hydrolysis of glycerophospholipids by the phosphatidylinosite-specific phospholipase C / N. M. Litvinko // Biophosphates and Their Analogous – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity. – Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V. – 1987. – P. 315–320.

45. Литвинко, Н. М. Особенности фосфолиполиза под действием производных 1,3-циклогександиона / Н. М. Литвинко, Д. О. Герловский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2012 . – № 2. – С. 77–81.

46. Литвинко, Н. М. Использование толуольного раствора лецитина при выделении фосфолипазы A_2 из поджелудочной железы свиньи / Н. М. Литвинко // Вес. Нац. акад. навук Беларус. Сер. хім. навук. – 1999. –№4. – С. 63–67.

47. Изучение специфичности фосфолипазы A_2 на субстратсодержащих структурах, имеющих разную надмолекулярную организацию / А. А. Ахрем [и др.] // Биохимия. – 1989. – Т. 54, № 4. – С. 687–693.

48. Litvinko, N. M. Study of phospholipase A_2 hydrolysis using conversion of methemoglobin to hemoglobin / N. M. Litvinko, G. M.Andreyuk, M. A. Kisel // FASEB Journal. – 1997. – Vol. 11, N 9. (C.A.1306). – P. 2623.

49. Патент BY №019670 «Способ определения общей антиоксидантной способности биологической жидкости с использованием липидной фазы / Н. М Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский; заявитель – Институт биоорганической химии НАН Беларуси, заявл. 13.01.11, заявка a 20110049.

50. Патент BY №019669. Композиция и способ определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский; заявитель – Институт биоорганической химии НАН Беларуси, заявл. 13.01.11, заявка a 20110048.

51. Литвинко, Н. М. Межфазный катализ липолитических реакций в биоорганической химии: особенности и практическое применение / Н. М. Литвинко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2015. – № 4. – С. 109–121.

52. Tappia, P. S. Phospholipases in Health and Disease / P. S. Tappia, N. S. Dhalla. – New York: Springer, 2014. – 410 p.

53. Долгосрочные приоритеты прикладной науки в России: / под ред. Л. М. Гохберга. – М.: Высш. шк. экономики, 2013. – 120 с.

54. Супрамолекулярный комплекс жирной кислоты с гемоглобином как индикатор фосфолиполиза для выявления экспериментального панкреатита / Литвинко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 82–87.

References

1. Bidei S. P., Brodelius P., Kabral I. M., *Immobilizovannye kletki i fermenty : metody* [Immobilized Cells and Enzymes], in Woodward, J. (ed.), Mir, Moscow, RU, 1988.

2. Buchholz K., "Reaction engineering parameters of immobilized biocatalysis", in *Advanced in biochemical engineering*, Fiechter A. (ed.), 1982, vol.24, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 39–41.

3. Osborn J. A., Jardine F. H., Young, J. F., Wilkinson, G., "The Preparation and Properties of Tris(triphenylphosphine) halogenorhodium(I) and Some Reactions Thereof Including Catalytic Homogeneous Hydrogenation of Olefins and Acetylenes and Their Derivatives", *Journal of the Chemical Society A*, 1966, pp. 1711–1732.

4. Poulsen P. B., "Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes", *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 1984, vol. 1, pp.121–140.

5. Berezin I. V., Klibanov A. M., Klyosov A. A., Martinek K., Svedas V. K., "Effect of ultrasound as a new method of studying conformational transitions in enzyme active-sites - pH-induced and temperature-induced conformational transitions in active-center of penicillin amidase", *FEBS Letters*, 1975, vol. 49, no. 3, pp. 325–328.

6. Varfolomeev S. D., Lushchekina S. V., Nemukhin A. V., Kulakova A. M., Kots E. D., Makhaeva G. F., Delakur E., Lokridzh O., Masson P., "Molecular polymorphism of human enzymes is the basis of individual sensitivity to drugs. Supercomputer modeling as a method of analysis of structural changes in protein and its catalytic activity", *Izvestiia Akademii nauk. Seriia khimicheskaia* [Russian Chemical Bulletin], 2016, no. 6, pp. 1592–1607.

7. Klyachko N. L., Bogdanova N. G., Levashov A. V., Martinek K., "Micellar enzymology – superactivity of enzymes in reversed micelles of surfactants solvated by water organic cosolvent mixtures", *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1992, vol. 57, no. 3, pp. 625–640.

8. Klyachko N. L., Ignatenko O. V., Dmitrieva N. F., Eshchina A. S., Rainina E. I., Kazarov A. K., Kuptsova O. S., Levashov A. V., "Matrix design for bacteriolytic enzyme encapsulation", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2006, vol. 16, no. 4, pp. 293–299.

9. Kudryashova E. V., Bronza V., Levashov A. V., "Influence of the lipid composition on the catalytic activity of acid phosphatase in reverse micelles", *Biokhimiia* [Biochemistry], 2009, vol. 74, no. 3, pp. 420–428.

10. Kudriashova E. V., Vasil'ev I. S., Zorov I. N., Sinitsyn A. P., Levashov A. V., "Stabilization of alkaline proteinase and cellulase by complexation with chitosan for use in synthetic detergents", *Bioorganicheskaia khimiia* [Russian Journal of Bioorganic Chemistry], 2009, vol. 35, no. 3, pp. 1–8.

11. Fedorchenko K. U., Ryabokon A. M., Kononikhin A. S., Mitrofanov S. I., Barmin V. V., Pikin O. V., Anaev E. H., Gachok I. V., Popov I. A., Nikolaev E. N., Chuchalin A. G., Varfolomeev S. D., "Early diagnosis of lung cancer based on proteome analysis of exhaled breath condensate", *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2016, vol.71, no. 2, pp.134–139.

12. Kononikhin A. S., Fedorchenko K. Yu, Ryabokon A. M., Starodubtceva N. L., Popov I. A., Zavialova M. G., Anaev E. C., Chuchalin A. G., Varfolomeev S. D., Nikolaev E. N., "Proteomic analysis of exhaled breath condensate for diagnostics of respiratory system diseases", *Biochemistry, Supplemental Series B*, 2016, vol. 10, no. 3, pp. 230–234.

13. Papkovskii D. B., Savitskii A. P., Ugarova N. N., Berezin I. V., Ponomarev G. V., "Fluorescent immunoassay. Synthesis, Spectral-Fluorescent and Immunological Properties of Conjugates of Corproproporphyrin 1 with Antibodies", *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* [Applied Biochemistry and Microbiology], 1989, vol. 25, no. 4, pp. 548–557.

14. Akhrem A. A., Lapko V. N., Lapko A. G., Shkumatov V. M., Chashchin V. L., "Isolation, structural organization and mechanism of action of mitochondrial steroid hydroxylating systems", *Acta Biologica et medica germanica*, 1979, vol. 38, no. 2–3, pp. 257–273.

15. Akhrem A. A., Litvinko N. M., Kisel M. A., Gerasimene G. B., Makaryunaite Y. P., Kulene V. V., "Influence of the charge and organization of the substrate on the activity of phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1984, vol. 49, no.3, pp. 317–321.

16. Tsyganova O. V., Kiseleva E. P., Vashkevich I. I., Priadko A. G., Sviridov O. V., "Characteristics of immunoaffinity chromatography and a new method for isolation of human thyroid peroxidase from subcellular fractions of thyroid gland", *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* [Applied Biochemistry and Microbiology], 2006, vol. 42, no. 2, pp. 236–246.

17. Metelitsa D. I., Eremin A. N., "Reversed surfactant micelles in organic solvents - a model of biological membranes", *Uspekhi biologicheskoi khimii* [Advances in Biochemistry], 1988, vol. 28, pp. 145–173.

18. Metelitsa D. I., *Aktivatsiia kisloroda fermentnymi sistemami* [Oxygen activation by enzyme systems], Nauka, Moscow, RU, 1982.

19. Metelitsa D. I., *Modelirovanie okislitel'no-vosstanovitel'nykh fermentov* [Modeling of oxidation-reduction enzymes], Nauka i tekhnika, Minsk, BY, 1984.

20. Naubatova M. K., Litvinko N. M., Kisel M. A., Akhrem A. A., "Study of lipolysis in model membranes in the presence of positively charged soluble proteins", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1992, vol. 57, no. 4, pp. 411–416.

21. Strushkevich N., Gilep A. A., Shen L., Arrowsmith C. H., Edward A. M., Usanov S. A., Park H.-W., "Structural Insights into Aldosterone Syntase Substrate Specificity and Targeting Inhibition", *Molecular Endocrinology*, 2013, vol. 27, no. 2, pp. 315–324.

22. Metelitsa D. I., "Oxygen activation by enzyme systems - cytochrome P-450 and other hemoproteins", *Uspekhi khimii* [Russian Chemical Reviews], 1982, vol. 51, no. 11, pp. 1819–1848.

23. Metelitza D. I., Eryomin A. N., Markina V. L., Karasjova E. I., "Catalytic activity and thermostability of dehydrogenase conjugates with cortisol and progesterone", *Bioconjugate Chemistry*, 1991, vol. 2, iss. 5, pp. 309–316.

24. Akhrem A. A., Litvinko N. M., Shemanova G. F., Dmitrieva L. N., Mironova A. T., "Immunochemical analysis of phospholipase A_2 and phospholipase C of Clostridium perfringens", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 1977, no. 5, pp. 113–118.

25. Fateev I. V., Kharitonova M. I., Antonov K. V., Konstantinova I. D., Stepanenko V. N., Esipov R. S., Seela F., Temburnikar K. W., Seley-Radtke K. L., Stepchenko V. A., Sokolov Y. A., Miroshnikov A. I., Mikhailopulo I. A., "Recognition of Artificial Nucleobases by E. coli Purine Nucleoside Phosphorylase versus its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base-Modified Nucleosides", *Chemistry - A European Journal*, 2015, vol. 21 (38), pp. 13401–13419.

26. Litvinko N. M., Shumilina T. A., Naubatova M. K., Akhrem A. A., "Study of stability of liposomes, potential drug carriers, to the action of phospholipase A_2", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1993, vol. 29, no. 3, pp. 361–366.

27. Kisel M. A., Kulik L., Tsybovsky I. S., Vlasov A. P., Vorob'yov M. S., Kholodova E. A., Zabarovskaya Z. V., "Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: Studies in the rat", *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 216, no.1–2, pp.105–114.

28. Vlasov A. P., Shubenok D. V., Sereda V. V., Fima D. V., Kravchuk 3. I., Odintsov S. G., Deev S. M., Martsev S. P., "Recombinant immunotoxin scFv4D5-barnase, specific for c-ErbB2-positive breast cancer cells: folding, stability, cytotoxic activity", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2009, no. 1, pp. 5–13.

29. Metelitsa D. I., Karaseva E. I., "Initiation and inhibition of free-radical processes in biochemical peroxide systems", *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* [Applied Biochemistry and Microbiology], 2007, vol. 43, no. 5, pp. 537–564.

30. Metelitsa D. I., Piven' N. V., Shadyro O. I., Grigorenko Iu. A. Dukhverchik L. N., Denisevich N. P., "Highly effective test systems for assessing the overall antioxidant activity of human biological fluids", *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekuliarnye osnovy funktsionirovaniia biosistem* [Proceedings of the Belarusian State University. Physiological, biochemical and molecular basis of functioning of biosystems], 2008, vol. 3, pt. 1, pp. 7–21.

31. Davydov R., Strushkevich N., Smil D., Yantsevich A., Gilep A., Usanov S., Hoffman B. M., "Evidence That Compound I Is the Active Species in Both the Hydroxylase and Lyase Steps by Which P450scc Converts Cholesterol to Pregnenolone: EPR/ENDOR/Cryoreduction/Annealing Studies", *Biochemistry*, 2015, vol. 54, pp. 7089–7097.

32. Litvinko N. M., *Aktivnost' fosfolipazy A_2 i S pri biokhimicheskom modelirovanii* [The activity of phospholipase A_2 and C in biochemical modeling], UP "Tekhnoprint", Minsk, BY, 2003.

33. Litvinko N. M., Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie "Institut bioorganicheskoi khimii Natsional'noi akademii nauk Belarusi", *Sposob vydeleniia fosfolipazy A_2* [A method for isolating phospholipase A_2], Baza patentov Respubliki Belarus', BY, Pat. 8416, 2002.

34. Shemanova G. F., Dmitrieva L. N., Litvinko N. M., Firsaeva T. M., Bulanova N. V., "Separation and purification of isoenzymes of phospholipase C of Clostridium perfringens", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1978, vol. 14 (3), pp. 314–318.

35. Litvinko N.M., Kisel' M. A., *Endogennye fosfolipazy A_2* [Endogenous phospholipase A_2], Nauka I tekhnika, Minsk, BY, 1991.

36. Litvinko N. M., Khurgin Yu. I., Kaverzneva E. D., "Anionic center of pancreatic phospholipase A_2", *Izvestiia Akademii nauk. Seriia khimicheskaia* [Russian Chemical Bulletin], 1976, vol. 25, no. 7, p. 1586.

37. Litvinko N. M., Khurgin Yu. I., Shemanova G. F., "Effect of low-molecular-weight substrate fragments and their analogs on activity of isoenzymes of phospholipase C from Clostridium perfringens of type A", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1977, vol. 42, no. 6 (II), pp. 838–842.

38. Shemanova G. F., Khurgin Iu. I., Litvinko N. M., Firsaeva T. M., Dmitrieva L. N., "The preparation of antibodies to hydrolytic enzymes and their detection in the passive hemagglutination reaction", *Immunologiia* [Immunology], 1981, no. 1, pp. 43–46.

39. Litvinko N. M., "Inhibition of phospholipases A_2 and C", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2005, no. 4, pp. 113–124.

40. Antonchik G. N., Gudko T. G., "Investigation of the protein-protein interaction of cytochrome P-450 and phospholipase A_2", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2015, no. 1, pp. 3–5.

41. Litvinko N. M., Khurgin Yu. I., Kaverzneva E. D., "The anionic site of hog pancreatic phospholipase A_2", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1977, vol. 42, no. 1(I), pp. 68–75.

42. Litvinko N. M., Drozhdeniuk A. P., "Formation of phospholipase A_2 complexes with nucleic acid fragments and methods for their disruption", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1996, vol. 32, no. 6, pp. 585–589.

43. Litvinko N. M., Kuchuro S. V., Zhukova M. V., "Dynamics of formation of lysoforms on enzymatic hydrolysis of phosphatidylalkanols", *Biokhimiia* [Biochemistry], 2002, vol. 67, no. 9, pp. 1027–1031.

44. Litvinko N. M., "Hydrolysis of glycerophospholipids вy the phosphatidylinosite-specific phospholipase C", *Biophosphates and Their Analogous – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, NL, 1987, pp. 315–320.

45. Litvinko N. M., Gerlovskii D. O., "Features of phospholipolysis under the action of 1,3-cyclohexanedione derivatives", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2012, no. 2, pp. 77–81.

46. Litvinko N. M., "The use of a toluene solution of lecithin in the isolation of phospholipase A_2 from the pig pancreas", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 1999, no. 4, pp. 63–67.

47. Akhrem A. A., Litvinko N. M., Shumilina T. A., Linnik O. I., Kisel' M. A., "A study of the specificity of phospholipase A_2 on substrate-containing structures having a different supramolecular organization", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1989, vol. 54, no. 4, pp. 687–693.

48. Litvinko N. M., Andreyuk G. M., Kisel M. A., "Study of phospholipase A_2 hydrolysis using conversion of methemoglobin to hemoglobin", *FASEB Journal*, 1997, vol. 11, no. 9 (C.A.1306), p. 2623.

49. Litvinko N. M., Skorostetskaia L. A., Gerlovskii D. O., Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, *Sposob opredeleniia obshchei antioksidantnoi sposobnosti biologicheskoi zhidkosti s ispol'zovaniem*

lipidnoi fazy [A method for determining the total antioxidant capacity of a biological fluid using a lipid phase], Baza patentov Respubliki Belarus', BY, Pat. 019670, 2015.

50. Litvinko N. M., Skorostetskaia L. A., Gerlovskii D. O., Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, *Kompozitsiia i sposob opredeleniia obshchei antioksidantnoi aktivnosti syvorotki krovi* [Composition and method for determinination of total antioxidant activity of blood serum], Baza patentov Respubliki Belarus', BY, Pat. 019669, 2015.

51. Litvinko N. M., "Interphase catalysis of lipolytic reactions in bioorganic chemistry: features and practical application (review)", *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2015, no. 4, pp. 109–121.

52. Tappia P. S., Dhalla N. S., *Phospholipases in Health and Disease*, Springer, New York, US, 2014.

53. Gokhberg L. M. (ed.), *Dolgosrochnye prioritety prikladnoi nauki v Rossii* [Long-term priorities of applied science in Russia], Natsional'nyi issledovatel'skii universitet "Vysshaia shkola ekonomiki", Moscow, RU, 2013.

54. Litvinko N. M., Skorostetskaia L. A., Gudko T. G., Timokhova M. M., Kamyshnikov V. S., Vizhinis E. I., Vorobei V. A., "Supramolecular fatty acid complex with hemoglobin as an indicator of phospholipolysis for detection of experimental pancreatitis", *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2016, vol. 60, no. 1, pp. 82–87.

Информация об авторах

Литвинко Наталья Михайловна – д-р. хим. наук, доцент, зав. лаб., Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al_h@mail.ru.

Information about the autors

Natalia M. Litvinko – D. Sc. (Chemistry), Associate Professor, Head of Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus), E-mail: al_h@mail.ru.