

ТОНКИЕ ХИМИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Fine Chemical Technologies

- | Теоретические основы химической технологии
- | Химия и технология органических веществ
- | Химия и технология лекарственных препаратов и биологически активных соединений
- | Биохимия и биотехнология
- | Синтез и переработка полимеров и композитов на их основе
- | Химия и технология неорганических материалов
- | Аналитические методы в химии и химической технологии
- | Математические методы и информационные системы в химической технологии

18(1)

2023





ISSN 2410-6593 (Print)
ISSN 2686-7575 (Online)

ТОНКИЕ ХИМИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Fine
Chemical
Technologies

- | Теоретические основы химической технологии
- | Химия и технология органических веществ
- | Химия и технология лекарственных препаратов
и биологически активных соединений
- | Биохимия и биотехнология
- | Синтез и переработка полимеров и композитов
на их основе
- | Химия и технология неорганических материалов
- | Аналитические методы в химии и химической технологии
- | Математические методы и информационные системы
в химической технологии

Тонкие химические технологии =
Fine Chemical Technologies
Том 18, № 1, 2023

Tonkie Khimicheskie Tekhnologii =
Fine Chemical Technologies
Vol. 18, No. 1, 2023

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1>
www.finechem-mirea.ru

**Тонкие химические технологии =
Fine Chemical Technologies
2023, том 18, № 1**

Научно-технический рецензируемый журнал «Тонкие химические технологии» освещает современные достижения фундаментальных и прикладных исследований в области тонких химических технологий, включая теоретические основы химической технологии, химию и технологию лекарственных препаратов и биологически активных соединений, органических веществ и неорганических материалов, биохимию и биотехнологию, синтез и переработку полимеров и композитов на их основе, аналитические и математические методы и информационные системы в химии и химической технологии.

Учредитель и издатель

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«МИРЭА – Российский технологический университет»
119454, РФ, Москва, пр-т Вернадского, д. 78.

Периодичность: один раз в два месяца.

Журнал основан в 2006 году. До 2015 года издавался под названием «Вестник МИТХТ» (ISSN 1819-1487).

Журнал входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов ВАК РФ.

Индексируется:

SCOPUS, DOAJ, Chemical Abstracts,
РИНЦ (Science Index), RSCI,
Ulrich's International Periodicals Directory

Главный редактор:

Тимошенко Андрей Всеволодович – д.т.н., к.х.н.,
профессор, МИРЭА – Российский технологический университет,
Москва, Российская Федерация. Scopus Author ID 56576076700,
ResearcherID Y-8709-2018,
<https://orcid.org/0000-0002-6511-7440>,
timoshenko@mirea.ru

Заместитель главного редактора:

Фомичёв Валерий Вячеславович – д.х.н., профессор,
МИРЭА – Российский технологический университет, Москва,
Российская Федерация. Scopus Author ID 57196028937,
<http://orcid.org/0000-0003-4840-0655>,
fomichev@mirea.ru

Выпускающий редактор:

Дураков Сергей Алексеевич – к.х.н., доцент,
МИРЭА – Российский технологический университет, Москва,
Российская Федерация, Scopus Author ID 57194217518,
ResearcherID AAS-6578-2020, <http://orcid.org/0000-0003-4842-3283>,
durakov@mirea.ru

Редакция:

Зав. редакцией к.т.н. Г.Д. Середина
Научные редакторы д.х.н., проф. Т.М. Буслаева
д.х.н., проф. А.А. Ищенко
д.т.н., проф. В.Ф. Корнюшко
д.т.н., проф. А.В. Марков
д.х.н., проф. Ю.П. Мирошников
д.х.н., проф. В.А. Тверской
Компьютерная верстка Л.Г. Семерня
119571, Москва, пр. Вернадского, 86, оф. Л-119.
Тел.: +7(495) 246-05-55 (#2-88)
E-mail: seredina@mirea.ru

Регистрационный номер и дата принятия решения о регистрации СМИ:
ПИ № ФС 77-74580 от 14.12.2018 г. СМИ зарегистрировано Федеральной
службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и
массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Индекс по Объединенному каталогу «Пресса России»: **36924**

**Tonkie Khimicheskie Tekhnologii =
Fine Chemical Technologies
2023, vol. 18, No. 1**

The peer-reviewed scientific and technical journal Fine Chemical Technologies highlights the modern achievements of fundamental and applied research in the field of fine chemical technologies, including theoretical bases of chemical technology, chemistry and technology of medicinal compounds and biologically active substances, organic substances and inorganic materials, biochemistry and biotechnology, synthesis and processing of polymers and polymeric composites, analytical and mathematical methods and information systems in chemistry and chemical technology.

Founder and Publisher

Federal State Budget
Educational Institution of Higher Education
“MIREA – Russian Technological University”
78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russian Federation.
Publication frequency: bimonthly.
The journal was founded in 2006. The name was Vestnik MITHHT until 2015 (ISSN 1819-1487).

The journal is included into the List of peer-reviewed science press of the State Commission for Academic Degrees and Titles of the Russian Federation.

The journal is indexed:

SCOPUS, DOAJ, Chemical Abstracts, Science Index, RSCI,
Ulrich's International Periodicals Directory

Editor-in-Chief:

Andrey V. Timoshenko – Dr. Sci. (Eng.), Cand. Sci. (Chem.),
Professor, MIREA – Russian Technological University,
Moscow, Russian Federation. Scopus Author ID 56576076700,
ResearcherID Y-8709-2018,
<https://orcid.org/0000-0002-6511-7440>,
timoshenko@mirea.ru

Deputy Editor-in-Chief:

Valery V. Fomichev – Dr. Sci. (Chem.), Professor,
MIREA – Russian Technological University, Moscow,
Russian Federation. Scopus Author ID 57196028937,
<http://orcid.org/0000-0003-4840-0655>,
fomichev@mirea.ru

Executive Editor:

Sergey A. Durakov – Cand. Sci. (Chem.), Associate
Professor, MIREA – Russian Technological University, Moscow,
Russian Federation, Scopus Author ID 57194217518,
ResearcherID AAS-6578-2020, <http://orcid.org/0000-0003-4842-3283>,
durakov@mirea.ru

Editorial staff:

Managing Editor Cand. Sci. (Eng.) Galina D. Seredina
Science editors Dr. Sci. (Chem.), Prof. Tatyana M. Buslaeva
Dr. Sci. (Chem.), Prof. Anatolii A. Ischenko
Dr. Sci. (Eng.), Prof. Valery F. Korniyushko
Dr. Sci. (Eng.), Prof. Anatolii V. Markov
Dr. Sci. (Chem.), Prof. Yuri P. Miroshnikov
Dr. Sci. (Chem.), Prof. Vladimir A. Tverskoy
Desktop publishing Larisa G. Semernya
86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russian Federation.
Phone: +7(495) 246-05-55 (#2-88)
E-mail: seredina@mirea.ru

The registration number ПИ № ФС 77-74580 was issued in December 14, 2018 by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media of Russia

The subscription index of *Pressa Rossii*: **36924**

Редакционная коллегия

Блохин Андрей Викторович – д.х.н., профессор
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
Scopus Author ID 7101971167, ResearcherID AAF-8122-2019,
<https://orcid.org/0000-0003-4778-5872>,
blokhin@bsu.by.

Верёвкин Сергей Петрович – д.т.н., профессор
Университета г. Росток, Росток, Германия.
Scopus Author ID 7006607848, ResearcherID G-3243-2011,
<https://orcid.org/0000-0002-0957-5594>,
Sergey.verevkin@uni-rostock.de.

Жижин Константин Юрьевич – член-корр.
Российской академии наук (РАН), д.х.н., профессор,
Институт общей и неорганической химии
им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Российская Федерация.
Scopus Author ID 6701495620, ResearcherID C-5681-2013,
<http://orcid.org/0000-0002-4475-124X>,
kyuzhizhin@igic.ras.ru.

Иванов Игорь Владимирович – д.х.н., профессор,
МИРЭА – Российский технологический университет,
Москва, Российская Федерация.
Scopus Author ID 34770109800, ResearcherID I-5606-2016,
<http://orcid.org/0000-0003-0543-2067>,
ivanov_i@mirea.ru.

Кардона Карлос Ариэль – PhD, профессор
Национального университета Колумбии, Манизалес, Колумбия.
Scopus Author ID 7004278560,
<http://orcid.org/0000-0002-0237-2313>,
ccardonaal@unal.edu.co.

Койфман Оскар Иосифович – академик РАН,
д.х.н., профессор, президент Ивановского государственного
химико-технологического университета, Иваново,
Российская Федерация.
Scopus Author ID 6602070468, ResearcherID R-1020-2016,
<http://orcid.org/0000-0002-1764-0819>,
president@isuct.ru.

Крутько Эльвира Тихоновна – д.т.н., профессор
Белорусского государственного технологического университета,
Минск, Беларусь.
Scopus Author ID 6602297257,
ela_krutko@mail.ru.

Мирошников Анатолий Иванович – академик РАН,
д.х.н., профессор, Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
член Президиума РАН, председатель Президиума
Пушкинского научного центра РАН, Москва,
Российская Федерация.
Scopus Author ID 7006592304, ResearcherID G-5017-2017,
aiv@ibch.ru.

Музафаров Азиз Мансурович – академик РАН,
д.х.н., профессор, Институт элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва,
Российская Федерация.
Scopus Author ID 7004472780, ResearcherID G-1644-2011,
<https://orcid.org/0000-0002-3050-3253>,
aziz@ineos.ac.ru.

Editorial Board

Andrey V. Blokhin – Dr. Sci. (Chem.), Professor,
Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Scopus Author ID 7101971167, ResearcherID AAF-8122-2019,
<https://orcid.org/0000-0003-4778-5872>,
blokhin@bsu.by.

Sergey P. Verevkin – Dr. Sci. (Eng.), Professor,
University of Rostock, Rostock, Germany.
Scopus Author ID 7006607848, ResearcherID G-3243-2011,
<https://orcid.org/0000-0002-0957-5594>,
Sergey.verevkin@uni-rostock.de.

Konstantin Yu. Zhizhin – Corresponding Member
of the Russian Academy of Sciences (RAS), Dr. Sci. (Chem.),
Professor, N.S. Kurnakov Institute of General and Inorganic
Chemistry of the RAS, Moscow, Russian Federation.
Scopus Author ID 6701495620, ResearcherID C-5681-2013,
<http://orcid.org/0000-0002-4475-124X>,
kyuzhizhin@igic.ras.ru.

Igor V. Ivanov – Dr. Sci. (Chem.), Professor,
MIREA – Russian Technological University, Moscow,
Russian Federation.
Scopus Author ID 34770109800, ResearcherID I-5606-2016,
<http://orcid.org/0000-0003-0543-2067>,
ivanov_i@mirea.ru.

Carlos A. Cardona – PhD (Eng.), Professor,
National University of Columbia, Manizales, Colombia.
Scopus Author ID 7004278560,
<http://orcid.org/0000-0002-0237-2313>,
ccardonaal@unal.edu.co.

Oskar I. Koifman – Academician at the RAS,
Dr. Sci. (Chem.), Professor, President of the Ivanovo State
University of Chemistry and Technology, Ivanovo,
Russian Federation.
Scopus Author ID 6602070468, ResearcherID R-1020-2016,
<http://orcid.org/0000-0002-1764-0819>,
president@isuct.ru.

Elvira T. Krut'ko – Dr. Sci. (Eng.), Professor,
Belarusian State Technological University,
Minsk, Belarus.
Scopus Author ID 6602297257,
ela_krutko@mail.ru.

Anatolii I. Miroshnikov – Academician at the RAS,
Dr. Sci. (Chem.), Professor, M.M. Shemyakin and Yu.A.
Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS,
Member of the Presidium of the RAS, Chairman of the Presidium
of the RAS Pushchino Research Center, Moscow,
Russian Federation.
Scopus Author ID 7006592304, ResearcherID G-5017-2017,
aiv@ibch.ru.

Aziz M. Muzafarov – Academician at the RAS,
Dr. Sci. (Chem.), Professor, A.N. Nesmeyanov Institute
of Organoelement Compounds of the RAS, Moscow,
Russian Federation.
Scopus Author ID 7004472780, ResearcherID G-1644-2011,
<https://orcid.org/0000-0002-3050-3253>,
aziz@ineos.ac.ru.

Новаков Иван Александрович – академик РАН, д.х.н., профессор, президент Волгоградского государственного технического университета, Волгоград, Российская Федерация.
Scopus Author ID 7003436556, ResearcherID I-4668-2015, <http://orcid.org/0000-0002-0980-6591>, president@vstu.ru.

Озерин Александр Никифорович – член-корр. РАН, д.х.н., профессор, Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Российская Федерация.
Scopus Author ID 7006188944, ResearcherID J-1866-2018, <https://orcid.org/0000-0001-7505-6090>, ozerin@ispm.ru.

Пакканен Тапани – PhD, профессор, Департамент химии, Университет Восточной Финляндии, Йоенсуу, Финляндия.
Scopus Author ID 7102310323, tapani.pakkanen@uef.fi.

Помбейро Армандо – академик Академии наук Лиссабона, PhD, профессор, президент Центра структурной химии Высшего технического института Университета Лиссабона, Португалия.
Scopus Author ID 7006067269, ResearcherID I-5945-2012, <https://orcid.org/0000-0001-8323-888X>, pombeiro@ist.utl.pt.

Пышный Дмитрий Владимирович – член-корр. РАН, д.х.н., профессор, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Российская Федерация.
Scopus Author ID 7006677629, ResearcherID F-4729-2013, <https://orcid.org/0000-0002-2587-3719>, pyshnyi@niboch.nsc.ru.

Сигов Александр Сергеевич – академик РАН, д.ф.-м.н., профессор, президент МИРЭА – Российского технологического университета, Москва, Российская Федерация.
Scopus Author ID 35557510600, ResearcherID L-4103-2017, sigov@mirea.ru.

Тойкка Александр Матвеевич – д.х.н., профессор, Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация.
Scopus Author ID 6603464176, ResearcherID A-5698-2010, <http://orcid.org/0000-0002-1863-5528>, a.toikka@spbu.ru.

Трохимчук Анджеј – д.х.н., профессор, Химический факультет Вроцлавского политехнического университета, Вроцлав, Польша.
Scopus Author ID 7003604847, andrzej.trochimczuk@pwr.edu.pl.

Цивадзе Аслан Юсупович – академик РАН, д.х.н., профессор, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Российская Федерация.
Scopus Author ID 7004245066, ResearcherID G-7422-2014, tsiv@phyche.ac.ru.

Ivan A. Novakov – Academician at the RAS, Dr. Sci. (Chem.), Professor, President of the Volgograd State Technical University, Volgograd, Russian Federation.
Scopus Author ID 7003436556, ResearcherID I-4668-2015, <http://orcid.org/0000-0002-0980-6591>, president@vstu.ru.

Alexander N. Ozerin – Corresponding Member of the RAS, Dr. Sci. (Chem.), Professor, Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials of the RAS, Moscow, Russian Federation.
Scopus Author ID 7006188944, ResearcherID J-1866-2018, <https://orcid.org/0000-0001-7505-6090>, ozerin@ispm.ru.

Tapani A. Pakkanen – PhD, Professor, Department of Chemistry, University of Eastern Finland, Joensuu, Finland.
Scopus Author ID 7102310323, tapani.pakkanen@uef.fi.

Armando J.L. Pombeiro – Academician at the Academy of Sciences of Lisbon, PhD, Professor, President of the Center for Structural Chemistry of the Higher Technical Institute of the University of Lisbon, Lisbon, Portugal.
Scopus Author ID 7006067269, ResearcherID I-5945-2012, <https://orcid.org/0000-0001-8323-888X>, pombeiro@ist.utl.pt.

Dmitrii V. Pyshnyi – Corresponding Member of the RAS, Dr. Sci. (Chem.), Professor, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russian Federation.
Scopus Author ID 7006677629, ResearcherID F-4729-2013, <https://orcid.org/0000-0002-2587-3719>, pyshnyi@niboch.nsc.ru.

Alexander S. Sigov – Academician at the RAS, Dr. Sci. (Phys. and Math.), Professor, President of MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russian Federation.
Scopus Author ID 35557510600, ResearcherID L-4103-2017, sigov@mirea.ru.

Alexander M. Toikka – Dr. Sci. (Chem.), Professor, Institute of Chemistry, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.
Scopus Author ID 6603464176, ResearcherID A-5698-2010, <http://orcid.org/0000-0002-1863-5528>, a.toikka@spbu.ru.

Andrzej W. Trochimczuk – Dr. Sci. (Chem.), Professor, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology, Wrocław, Poland.
Scopus Author ID 7003604847, andrzej.trochimczuk@pwr.edu.pl.

Aslan Yu. Tsivadze – Academician at the RAS, Dr. Sci. (Chem.), Professor, A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the RAS, Moscow, Russian Federation.
Scopus Author ID 7004245066, ResearcherID G-7422-2014, tsiv@phyche.ac.ru.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

**Теоретические основы
химической технологии**

*Клаузнер П.С., Рудаков Д.Г., Анохина Е.А.,
Тимошенко А.В.*

Оценка энергетической эффективности схем
неадиабатической ректификации смеси
ацетон–толуол–*n*-бутанол с использованием
экстрактивного агента в первой колонне

7

**Химия и технология
органических веществ**

*Мусин А.И., Султанова Д.С., Борисова Ю.Г.,
Мудрик Т.П., Даминев Р.Р.*

Конденсация вторичных аминов с СН-кислотами
и формальдегидом под действием
микроволнового излучения

21

*Севостьянова Н.Т., Баташев С.А.,
Родионова А.С.*

Совмещенный процесс синтеза
циклогексилциклогексанкарбоксилата
из циклогексанола и СО, катализируемый
системой Pd(OAc)₂–PPh₃–*n*-толуолсульфо-
кислота

29

**Theoretical Bases
of Chemical Technology**

*Klauzner P.S., Rudakov D.G., Anokhina E.A.,
Timoshenko A.V.*

Energy efficiency of diabatic
distillation schemes for an
acetone–toluene–*n*-butanol mixture
with an entrainer in the first column

**Chemistry and Technology
of Organic Substances**

*Musin A.I., Sultanova D.S., Borisova Yu.G.,
Mudrik T.P., Daminev R.R.*

Condensation of secondary amines
with CH-acids and formaldehyde
under the influence of microwave radiation

*Sevostyanova N.T., Batashev S.A.,
Rodionova A.S.*

Combined process of cyclohexyl
cyclohexanecarboxylate synthesis
from cyclohexanol and CO catalyzed
by the Pd(OAc)₂–PPh₃–*p*-toluenesulfonic
acid system

**Химия и технология лекарственных
препаратов и биологически
активных соединений**

Ha A.C., Le T.M.

Screening of medicinal plant extracts
in Vietnam and investigation of their
combination for preventing and treating gout

Биохимия и биотехнология

*Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Банделюк А.С.,
Верховская Л.В., Вискова Н.Ю., Авдонина Е.Д.,
Прокофьев В.В., Рябова Е.И., Есмагамбетов И.Б.,
Первойкина К.А., Богачева Е.А., Лысенко А.А.,
Шмаров М.М.*

Способ получения рекомбинантных
антител, продуцируемых клеточной линией,
трансдуцированной рекомбинантными
аденовирусами

**Аналитические методы в химии
и химической технологии**

*Постников П.В., Радус Ф.В., Ефимова Ю.А.,
Пронина И.В.*

Определение возможных микроРНК-маркеров
злоупотребления препаратами кобальта
методом ПЦР в реальном времени
с использованием панелей сигнального пути
гипоксии

**Chemistry and Technology
of Medicinal Compounds
and Biologically Active Substances**

Ha A.C., Le T.M.

Screening of medicinal plant extracts
in Vietnam and investigation of their
combination for preventing and treating gout

Biochemistry and Biotechnology

*Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Bandelyuk A.S.,
Verkhovskaya L.V., Viskova N.Yu., Avdonina E.D.,
Prokofiev V.V., Ryabova E.I., Esmagamбетov I.B.,
Pervoykina K.A., Bogacheva E.A., Lysenko A.A.,
Shmarov M.M.*

Method for obtaining recombinant
antibodies produced by a cell line
transduced with recombinant
adenoviruses

**Analytical Methods in Chemistry
and Chemical Technology**

*Postnikov P.V., Radus F.V., Efimova Yu.A.,
Pronina I.V.*

Determination of possible
microRNA-markers of cobalt
abuse by real-time qPCR
using hypoxia signaling pathway
panels

38

48

65

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

THEORETICAL BASES OF CHEMICAL TECHNOLOGY

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-7-20>



УДК 660:51.001.57+66

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Оценка энергетической эффективности схем неадиабатической ректификации смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с использованием экстрактивного агента в первой колонне

П.С. Клаузнер[✉], Д.Г. Рудаков, Е.А. Анохина, А.В. Тимошенко

МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

[✉] Автор для переписки, e-mail: klauzner@mirea.ru

Аннотация

Цели. Исследовать эффективность применения различных вариантов организации процесса неадиабатической ректификации при разделении смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол экстрактивной ректификацией с диметилформамидом в схеме с использованием экстрактивного агента в первой колонне.

Методы. Математическое моделирование проводилось в программном комплексе Aspen Plus v. 12.1. Для моделирования парожидкостного равновесия применяли уравнение локальных составов Non-Random Two Liquid. Параметрическая оптимизация неадиабатических схем проводилась по критерию приведенных энергетических затрат.

Результаты. На основе схемы экстрактивной ректификации смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с использованием разделяющего агента в первой колонне было рассмотрено четыре варианта организации схем неадиабатической ректификации, как с применением повышения температуры потоков за счет сжатия в компрессоре, так и без него.

Выводы. Показано, что применение неадиабатических схем в экстрактивной ректификации смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с диметилформамидом позволяет снизить приведенные энергетические затраты на 11–17%, при этом максимальное снижение энергозатрат достигается в схеме с использованием компрессора. Однако эффективность схем без компрессора ниже незначительно, но технологическое оформление таких решений существенно проще.

Ключевые слова: экстрактивная ректификация, теплоинтеграция, неадиабатическая ректификация, энергосбережение

Для цитирования: Клаузнер П.С., Рудаков Д.Г., Анохина Е.А., Тимошенко А.В. Оценка энергетической эффективности схем неадиабатической ректификации смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с использованием экстрактивного агента в первой колонне. *Тонкие химические технологии*. 2023;18(1):7–20. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-7-20>

RESEARCH ARTICLE

Energy efficiency of diabatic distillation schemes for an acetone–toluene–*n*-butanol mixture with an entrainer in the first column

Pavel S. Klauzner✉, Danila G. Rudakov, Elena A. Anokhina, Andrey V. Timoshenko

MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

✉ Corresponding author, e-mail: klauzner@mirea.ru

Abstract

Objectives. To investigate the effectiveness of various options for organizing the process of diabatic distillation in the separation of a mixture of acetone–toluene–*n*-butanol by extractive distillation (ED) with dimethylformamide as an entrainer in a scheme where an entrainer is used in the first column.

Methods. Mathematical modeling in the Aspen Plus v. 12.1 software package was used as the primary research method. The local Non-Random Two Liquid composition equation was used as a model for describing vapor–liquid equilibrium. Parametric optimization of diabatic schemes was carried out according to the criterion of reduced energy costs.

Results. Based on ED scheme for an acetone–toluene–*n*-butanol mixture with an entrainer in the first column, four options for organizing diabatic distillation schemes were considered, both with and without increasing the temperature of the flows due to compression.

Conclusion. It is shown that the use of diabatic schemes in the ED of an acetone–toluene–*n*-butanol mixture with dimethylformamide can decrease energy consumption by 11–17%. While the maximum reduction in energy consumption is achieved in a scheme using a compressor, the efficiency of schemes without a compressor is slightly lower. Nevertheless, the technological design of the latter is much simpler.

Keywords: extractive distillation, heat integration, diabatic distillation, energy saving

For citation: Klauzner P.S., Rudakov D.G., Anokhina E.A., Timoshenko A.V. Energy efficiency of diabatic distillation schemes for an acetone–toluene–*n*-butanol mixture with an entrainer in the first column. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):7–20 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-7-20>

ВВЕДЕНИЕ

Экстрактивная ректификация (ЭР) – широко применяемый в крупнотоннажных процессах основного органического и нефтехимического синтеза метод разделения азеотропных смесей и смесей компонентов с относительной летучестью, близкой к 1. Как и обычная ректификация, этот процесс характеризуется низкой термодинамической эффективностью, поэтому снижение энергетических затрат на его реализацию является важной задачей. Для повышения энергетической эффективности ЭР существует ряд методов, среди которых можно отметить подбор разделяющих агентов с высокой селективностью [1], оптимизацию схем разделения [2], а также различные варианты внутренней и внешней теплоинтеграции.

К внутренней теплоинтеграции в публикациях [3–5] относят применение комплексов с частично и полностью связанными тепловыми и материальными потоками. К настоящему времени исследовано применение комплексов со связанными тепловыми и материальными потоками в ЭР различных смесей [6–9], предложен эмпирический критерий для предварительной оценки энергетической эффективности комплексов с частично связанными тепловыми и материальными потоками в ЭР [10] и алгоритмы их оптимизации [9]. Применение в ЭР комплекса с полностью связанными тепловыми и материальными потоками рассматривается, например, в работах [11, 12].

Внешняя теплоинтеграция может быть реализована за счет организации обогрева кипятильника одной колонны теплом, отводимым в конденсаторе другой колонны, а необходимая для осуществления теплообмена разница температур достигается за счет подбора давления в колоннах. Такие методы рассмотрены в работах [13–15]. Другим вариантом осуществления внешней теплоинтеграции является применение тепловых насосов, рассмотренное, к примеру, в работах [16–19].

Интересным вариантом теплоинтеграции является применение комплексов типа HIDIc (heat integrated distillation column). Вместо передачи теплоты с верха колонны в куб, как в тепловом насосе, теплопередача в HIDIc осуществляется между тарелками отгонной и укрепляющей секций колонны, обеспечивая непрерывный или ступенчатый подвод или отвод теплоты в каждой из секций. В этом случае, для обеспечения положительной разности температур между соответствующими тарелками укрепляющая секция должна работать при более высоком давлении, чем отгонная секция.

Концепция внутренней теплоинтеграции подробно рассмотрена авторами [20] в 1977 г. Применение таких схем в процессах ЭР рассмотрено в работах [21, 22]. Эффективность схем HIDIc была проверена и подтверждена экспериментально [23]. Однако обеспечение эффективного теплообмена между секциями является достаточно сложной конструкционной задачей. В различных работах предлагается использовать концентрические, многотрубные, разделенные перегородками с теплообменными панелями [24] или иные [25] конфигурации. Дополнительные трудности практической реализации схем с HIDIc связаны со сложной управляемостью процесса [26].

Еще одним возможным вариантом осуществления теплоинтеграции является применение схем неадиабатической ректификации. Они подразумевают внешний подвод (или отвод) теплоты на тарелки колонн за счет интеграции тепла потоков между различными аппаратами схемы. Преимуществом таких решений по сравнению с комплексами HIDIc является простота организации теплоинтеграции – для нее достаточно стандартного теплообменного оборудования. По сравнению со схемами с применением тепловых насосов, схемы неадиабатической ректификации позволяют использовать компрессоры с меньшей степенью сжатия, а в ряде случаев обходиться без них. Однако применение схем неадиабатической ректификации в данный момент рассмотрено явно недостаточно [27].

Цель работы заключается в оценке энергетической эффективности схем неадиабатической ректификации в процессе ЭР смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с диметилформамидом (ДМФА) в качестве разделяющего агента. Смесь ацетон–толуол–*n*-бутанол – это смесь растворителей, применяемых при производстве стабилина-9, который используется в качестве термостабилизатора полиамида. Система азеотропна. В ней имеется один азеотроп с минимумом температуры кипения в бинарной составляющей толуол–*n*-бутанол. В исследовании Л.А. Пирог¹ для разделения данной смеси предложено использовать ЭР с тяжелокипящим разделяющим агентом ДМФА. В настоящей работе будут рассмотрены схемы неадиабатической ректификации, полученные на основе одной из двух возможных схем разделения, предложенных Пирог. Схема представлена на рис. 1.

¹ Пирог Л.А. *Оценка эффективности агентов при разделении неидеальных смесей экстрактивной ректификацией*: дис. ... канд. техн. наук. М. 1987. 204 с. [Pirog L.A. *Evaluation of efficiency agents in the separation of non-ideal mixtures of extractive distillation*. Cand. Sci. Thesis (Eng.). Moscow; 1987. 204 p. (in Russ.).]

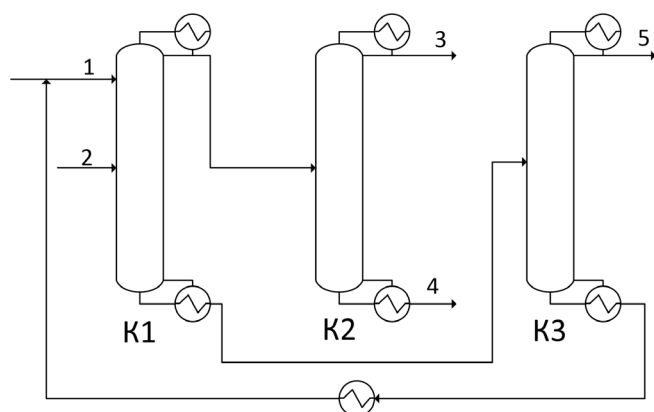


Рис. 1. Традиционная схема ЭР смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с разделяющим агентом ДМФА: Здесь и далее: K1 – колонна ЭР; K2 – колонна выделения ацетона; K3 – колонна регенерации разделяющего агента; 1 – разделяющий агент ДМФА; 2 – исходная смесь; 3 – ацетон; 4 – толуол, 5 – *n*-бутанол.

Fig. 1. Conventional scheme of extractive distillation for an acetone–toluene–*n*-butanol mixture with dimethylformamide (DMF) as an entrainer: Hereinafter: K1 – extractive distillation column, K2 – acetone–toluene separation column, K3 – entrainer regeneration column; 1 – entrainer (DMF); 2 – feed; 3 – acetone; 4 – toluene, 5 – *n*-butanol.

РАСЧЕТНАЯ ЧАСТЬ

В качестве основного метода исследования применяли математическое моделирование и вычислительный эксперимент, все расчеты проводили в программном комплексе Aspen Plus v.12.1 (Aspen Technology, США). Моделирование и оптимизация традиционной схемы ЭР смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с ДМФА, представленной на рис. 1, были проведены в диссертации Е.А. Анохиной². Эти данные были взяты нами в качестве исходных для разработки схем неадиабатической ректификации. В качестве модели описания парожидкостного равновесия в системе ацетон–толуол–*n*-бутанол–ДМФА выбрано уравнение Non-Random Two Liquid (NRTL) с параметрами, опубликованными в работе Анохиной (сноска 2).

Мы рассмотрели разделение исходной смеси, содержащий 71.3 мас. % ацетона, 14.7 мас. % толуола и 14.0 мас. % *n*-бутанола. Скорость подачи питания – 1000 кг/ч, температура 61.8 °С, давление – 101.3 кПа. Давление верха колонн было принято равным 101.3 кПа, рассматривались

² Анохина Е.А. *Экстрактивная ректификация в комплексах с частично связанными тепловыми и материальными потоками*: дис. ... д-ра техн. наук. М. 2020. 549 с. [Anokhina E.A. *Extractive distillation in complexes with partially coupled heat and material flows*. Dr. Sci. Thesis (Eng.). Moscow; 2020. 549 p. (in Russ.).]

колонны с теоретическими тарелками. Расчеты выполнялись в проектно-проверочном режиме с закрепленным качеством продуктовых потоков. Концентрацию ацетона и *n*-бутанола в продуктовых потоках задавали постоянной и равной 99.5 мас. %; концентрацию толуола равной 99.6 мас. %; концентрацию ДМФА равной 99.99 мас. % Рабочие параметры традиционной схемы представлены в табл. 1.

Одним из ключевых условий для организации схем неадиабатической ректификации является разность температуры ΔT потока, теплоту которого предполагается использовать (источник тепла), и температуры на тарелках отгонной секции колонн, в которые это тепло направлено (приемник тепла), достаточной для обеспечения движущей силы теплообмена. Исходя из этого, при моделировании схем ΔT между источником и приемником тепла принимали равной не менее 10 °С. Для предварительной оценки возможности реализации схемы неадиабатической ЭР с заданными параметрами теплообмена и выбора необходимой степени сжатия E_{comp} в компрессоре, необходимо провести оценку температурных профилей всех колонн традиционной схемы. Температурные профили представлены на рис. 2.

Видно, что наиболее высокие температуры наблюдаются в укрепляющей секции колонны K3. Температуры верха колонн K1 и K2 достаточно близки, однако дистиллят колонны K2 содержит практически чистый ацетон, в то время как дистиллят колонны K1 – смесь ацетона и толуола. При использовании такого потока для обеспечения переноса тепла может изменяться его состав, что в свою очередь повлечет изменение режима работы колонны K2, поэтому синтез схем неадиабатической ректификации проводится с использованием только верхних потоков пара колонн K2 и K3. На основе анализа профилей можно предложить следующие варианты неадиабатических схем ЭР:

Схема I. Для обогрева колонны K2 применяется паровой поток верха колонны K3. В данном случае температура потока достаточна, чтобы обеспечить передачу тепла без использования компрессора (рис. 3а).

Схема II. Обогрев колонны K1 осуществляется паровым потоком верха колонны K3. Подвод тепла к 24-й тарелке возможен без применения компрессора, для подвода тепла ниже необходимо повышение температуры за счет сжатия пара в компрессоре со степенями сжатия от $E_{\text{comp}} = 1.1$ до $E_{\text{comp}} = 2.0$ (рис. 3б).

Схема III. Обогрев колонны K1 паровым потоком верха колонны K2. При этом степени сжатия пара в компрессоре должны быть больше 3.1 (рис. 3с).

Таблица 1. Рабочие параметры традиционной схемы ЭР (см. сноску 2)
Table 1. Operating parameters of conventional extractive distillation scheme (Footnote 2)

Параметры Parameters	K1	K2	K3
N_{total}	32	14	44
N_F	23	8	10
N_S	10	–	–
Q_{reb} , кВт Q_{reb} , kW	200	151	59.3
Q_{cond} , кВт Q_{cond} , kW	185	148	59.1
R	0.55	0.46	1.6
T_{cond} , °C	58.7	56.2	117.8
T_{reb} , °C	135.7	110.2	151.8
S , кг/ч S , kg/h	190.68	–	–
T_S , °C	60	–	–
Q_{total} , кВт Q_{total} , kW	410		

Примечание: K1 – колонна ЭР; K2 – колонна выделения ацетона; K3 – колонна регенерации разделяющего агента; N_{total} – суммарное число тарелок в колонне; N_F – номер тарелки питания в колонне; N_S – номер тарелки с разделяющим агентом в колонне; Q_{reb} – тепловая нагрузка кипятильника; Q_{cond} – тепловая нагрузка конденсатора; R – флегмовое число; T_{cond} – температура конденсатора; T_{reb} – температура кипятильника; S – расход разделяющего агента; T_S – температура разделяющего агента; Q_{total} – суммарная тепловая нагрузка.

Note: K1 is the extractive distillation column; K2 is the acetone separation column; K3 is the entrainer regeneration column; N_{total} is the total number of plates in a column; N_F is the feed plate number in a column; N_S is the number of the plate with the entrainer in a column; Q_{reb} is the reboiler heat duty; Q_{cond} is the condenser heat duty; R is the reflux ratio; T_{cond} is the condenser temperature; T_{reb} is the reboiler temperature; S is the entrainer flow rate; T_S is the entrainer temperature; Q_{total} is the total heat duty.

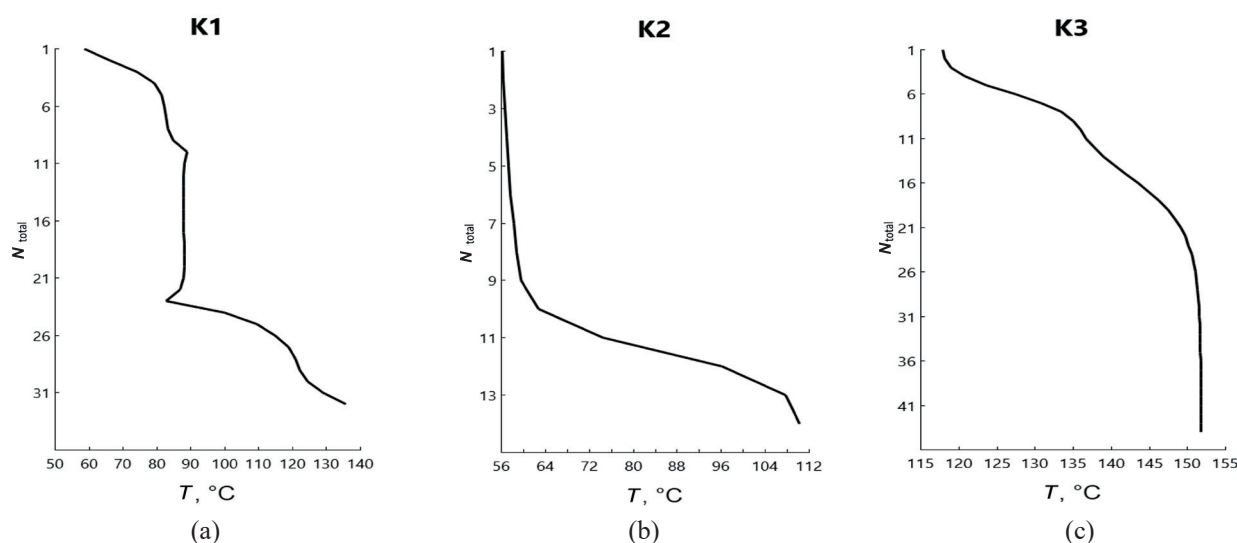


Рис. 2. Температурные профили колонн традиционной схемы ЭР: (а) колонна K1, (б) колонна K2, (с) колонна K3.

Fig. 2. Temperature profiles of columns of conventional extractive distillation scheme: (a) column K1, (b) column K2, (c) column K3.

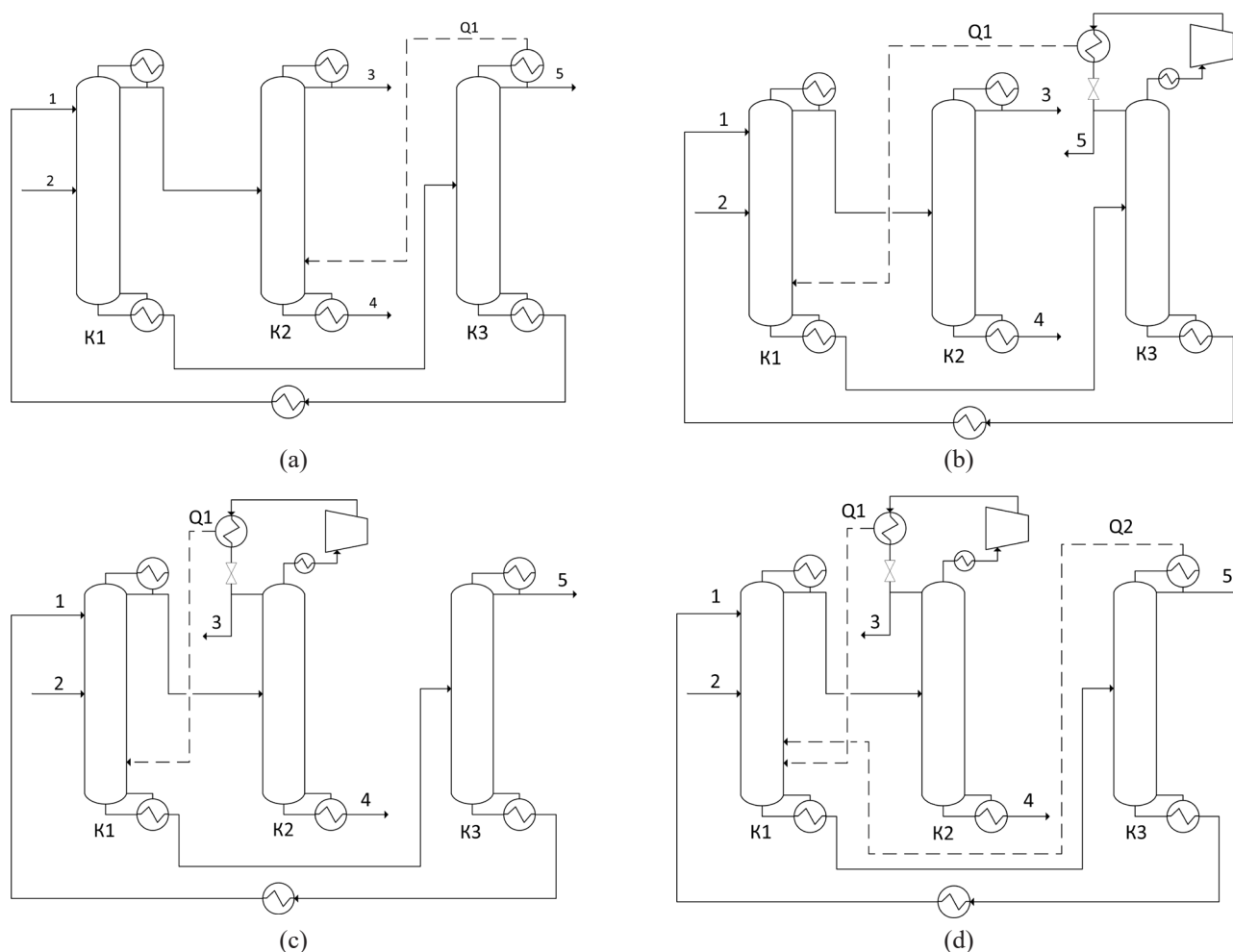


Рис. 3. Неадиабатические схемы ЭР: (а) Схема I, (б) Схема II, (с) Схема III, (д) Схема IV.

Fig. 3. Diabatic extractive distillation schemes: (a) Scheme I, (b) Scheme II, (c) Scheme III, (d) Scheme IV.

Схема IV. Обогрев колонны K1 паровыми потоками верха колонн K2 и K3. Так как «горячие» компрессоры являются дорогостоящим оборудованием, применение более чем одного компрессора в схеме, вероятно, будет экономически нецелесообразно. Поэтому рассмотрен вариант, при котором теплота парового потока колонны K3 подводится к 24-й тарелке колонны K1, а компрессор установлен только на паровом потоке колонны K2 (рис. 3д).

Вышеперечисленные варианты неадиабатических схем представлены на рис. 3. В схемах, где применяется компрессор, для предотвращения возможной кавитации перед ним установлен дополнительный подогреватель, тепловая нагрузка которого обозначена Q_{PH} .

Как и в схемах с тепловыми насосами, в неадиабатических схемах присутствуют «горячие» компрессоры и дополнительное теплообменное оборудование, при этом для привода компрессора обычно применяется электродвигатель. В случае применения тепловых насосов в процессах ректификации авторы [28] предложили простую

формулу для оценки энергетической эффективности через приведенные энергетические затраты (Q_{cons}):

$$Q_{cons} = Q_{total} + 3W_{comp}, \quad (1)$$

где Q_{total} – суммарные энергетические затраты в кипятыльниках колонн, кВт, а W_{comp} – потребляемая компрессором мощность, кВт.

Этот метод можно использовать и для оценки энергетических затрат в других схемах ректификации, включающих в себя компрессоры, в том числе и в неадиабатических схемах.

Оптимизация неадиабатических схем проводилась по критерию приведенных энергозатрат Q_{cons} . При этом параметрами оптимизации являлись: положение тарелки подвода тепла к отгонной секции колонны N_{HE} ; количество подводимого тепла Q_{HE} , а также необходимая для обеспечения принятого значения ΔT степень сжатия пара в компрессоре E_{comp} . Сама процедура оптимизации, однако, имела некоторые различия для каждой из рассматриваемых схем. Так, в Схеме I

температура потока, выходящего сверху колонны К3 ($T_{\text{cond}} = 117.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$), позволяет обеспечить подвод тепла к любой из тарелок колонны К2, при этом может быть использована вся теплота, отдаваемая потоком при полной конденсации, – 59.1 кВт. Таким образом, оптимизация данной схемы сводится к подбору оптимального положения тарелки подвода тепла N_{HE} . Результат такого подбора представлен в табл. 2.

Можно видеть, что наиболее эффективным оказывается подвод тепла к нижней тарелке колонны. При подводе тепла к тарелкам отгонной секции, расположенным выше 13-й, флегмовое число в колонне несколько возрастает, как и

нагрузка на кипятильник, однако значительного влияния на режим работы колонны при этом не наблюдается. Оптимальные рабочие параметры Схемы I приведены в табл. 3.

В Схеме II (рис. 3b) подвод тепла верхнего потока колонны К3 без применения компрессора возможен только к верхней (24-й) тарелке отгонной секции колонны К1, этот случай в табл. 4 приведен как $E_{\text{comp}} = 1$. В остальных случаях для достижения необходимой разницы температур необходимо повышать давление и определять необходимые степени сжатия. Из формулы (1) следует, что максимальная энергетическая эффективность будет достигнута

Таблица 2. Оптимизация рабочих параметров неадиабатической Схемы I

Table 2. Optimization of operation parameters for diabatic Scheme I

N_{HE}	$Q_{\text{HE}}, \text{ кВт}$ $Q_{\text{HE}}, \text{ kW}$	$Q_{\text{reb}}^{\text{K2}}, \text{ кВт}$ $Q_{\text{reb}}^{\text{K2}}, \text{ kW}$	R^{K2}
9	59.1	93.80	0.48
10	59.1	92.26	0.47
11	59.1	91.87	0.46
12	59.1	91.74	0.46
13	59.1	91.66	0.46

Примечание: N_{HE} – номер тарелки подвода тепла в теплообменнике; Q_{HE} – тепловая нагрузка теплообменника; К2 – колонна выделения ацетона; $Q_{\text{reb}}^{\text{K2}}$ – тепловая нагрузка кипятильника в К2; R^{K2} – флегмовое число в К2.

Note: N_{HE} is the heat supply plate number in the heat exchanger; Q_{HE} is the exchanger heat duty; К2 is the acetone separation column; $Q_{\text{reb}}^{\text{K2}}$ is the reboiler heat duty in К2; R^{K2} is the reflux ratio in К2.

Таблица 3. Оптимальные рабочие параметры неадиабатической Схемы I

Table 3. Optimal operation parameters for diabatic Scheme I

Параметры Parameters	К1	К2	К3
N_{total}	32	14	44
N_{HE}	–	13	–
$Q_{\text{reb}}, \text{ кВт}$ $Q_{\text{reb}}, \text{ kW}$	200	91.7	59.3
R	0.55	0.46	1.6
$Q_{\text{HE}}, \text{ кВт}$ $Q_{\text{HE}}, \text{ kW}$	–	59.1	–
$Q_{\text{cons}}, \text{ кВт}$ $Q_{\text{cons}}, \text{ kW}$	351		

Примечание: N_{total} – суммарное число тарелок в колонне; N_{HE} – номер тарелки подвода тепла в теплообменнике; Q_{reb} – тепловая нагрузка кипятильника; R – флегмовое число; Q_{HE} – тепловая нагрузка теплообменника; Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией.

Note: N_{total} is the total number of plates in the column; N_{HE} is the heat supply plate number in the heat exchanger; Q_{reb} is the reboiler heat duty; R is the reflux ratio; Q_{HE} is the exchanger heat duty; Q_{cons} is the reduced energy consumption in the scheme with thermal integration.

при минимальном W_{comp} , а соответственно, и минимальной E_{comp} , при которой обеспечивается необходимая разница температур. Следует отметить, что при $E_{\text{comp}} = 2$ возможен подвод тепла уже в кипятильник колонны К1, то есть реализация адиабатической схемы с тепловым насосом. Результаты оптимизации представлены в табл. 4.

Можно видеть, что максимальное снижение нагрузки на кипятильник колонны достигается при подводе тепла к 30-й тарелке, однако наименьшими приведенными энергозатратами характеризуется вариант с подводом тепла на 24-ю тарелку и без компрессора. Рабочие параметры этого варианта представлены в табл. 5.

Таблица 4. Оптимизация рабочих параметров неадиабатической Схемы II
Table 4. Optimization of operation parameters for diabatic Scheme II

E_{comp}	$\frac{W_{\text{comp}}, \text{ кВт}}{W_{\text{comp}}, \text{ kW}}$	N_{HE}	$\frac{Q_{\text{HE}}, \text{ кВт}}{Q_{\text{HE}}, \text{ kW}}$	$\frac{Q_{\text{reb}}^{\text{K1}}, \text{ кВт}}{Q_{\text{reb}}^{\text{K1}}, \text{ kW}}$	$\frac{Q_{\text{PH}}, \text{ кВт}}{Q_{\text{PH}}, \text{ kW}}$	$\frac{Q_{\text{cons}}, \text{ кВт}}{Q_{\text{cons}}, \text{ kW}}$
1.0	0	24	59.1	134.0	0	134.0
1.1	0.6	25	59.3	132.6	0.4	134.8
1.2	1.1	26	58.2	133.0	0.4	136.7
1.3	1.6	27	58.0	132.8	0.4	138.0
1.4	2.1	28	57.5	132.6	0.4	139.3
1.5	2.5	30	57.4	132.0	0.6	140.1
1.7	3.3	31	56.9	132.1	0.7	142.7
2.0	4.4	32	56.7	131.3	0.9	145.4

Примечание: E_{comp} – степень сжатия компрессора; W_{comp} – потребляемая мощность компрессора; N_{HE} – номер тарелки подвода тепла в теплообменнике; Q_{HE} – тепловая нагрузка теплообменника; К1 – колонна ЭР; $Q_{\text{reb}}^{\text{K1}}$ – тепловая нагрузка кипятильника К1; Q_{PH} – тепловая нагрузка в предподогревателе; Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией.

Note: E_{comp} is the compressor compression ratio; W_{comp} is the compressor power consumption; N_{HE} is the heat supply plate number in the heat exchanger; Q_{HE} is the exchanger heat duty; К1 is the extractive distillation column; $Q_{\text{reb}}^{\text{K1}}$ is the reboiler heat duty in К1; Q_{PH} is the heat duty in the preheater; Q_{cons} is the reduced energy consumption in the scheme with thermal integration.

Таблица 5. Оптимальные рабочие параметры неадиабатической Схемы II
Table 5. Optimal operation parameters for diabatic Scheme II

Параметры Parameters	К1	К2	К3
N_{total}	32	14	44
N_{HE}	24	–	–
$\frac{Q_{\text{reb}}, \text{ кВт}}{Q_{\text{reb}}, \text{ kW}}$	134	151	59.3
R	0.50	0.46	1.6
$\frac{Q_{\text{HE}}, \text{ кВт}}{Q_{\text{HE}}, \text{ kW}}$	59.1	–	–
$\frac{Q_{\text{cons}}, \text{ кВт}}{Q_{\text{cons}}, \text{ kW}}$	344		

Примечание: N_{total} – суммарное число тарелок в колонне; N_{HE} – номер тарелки подвода тепла в теплообменнике; Q_{reb} – тепловая нагрузка кипятильника; R – флегмовое число; Q_{HE} – тепловая нагрузка теплообменника; Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией.

Note: N_{total} is the total number of plates in the column; N_{HE} is the heat supply plate number in the heat exchanger; Q_{reb} is the reboiler heat duty; R is the reflux ratio; Q_{HE} is the exchanger heat duty; Q_{cons} is the reduced energy consumption in the scheme with thermal integration.

Аналогично проводилась оптимизация Схемы III (рис. 3с), однако было установлено, что для каждой тарелки N_{HE} существует предельное количество подведенной теплоты Q_{HE}^{max} , выше которого получение дистиллята заданного качества становится невозможным. При этом, чем выше в колонне расположена тарелка N_{HE} , тем меньше величина Q_{HE}^{max} . Вероятно, это связано с тем, что при фиксированном N_{HE} с ростом Q_{HE} происходит увеличение суммарной концентрации *n*-бутанола и ДМФА на тарелках укрепляющей секции, причем, чем ближе к экстрактивной секции расположен уровень подвода тепла, тем заметнее влияние Q_{HE} на эту концентрацию.

Результаты оптимизации представлены в табл. 6, а оптимальные рабочие параметры – в табл. 7.

Как уже упоминалось, при моделировании Схемы IV (рис. 3д) было принято, что в схеме используется только один компрессор. Так как подвести теплоту парового потока колонны КЗ без дополнительного сжатия возможно только на 24-ю тарелку, то мы имеем закрепленное значение номера тарелки подачи первого потока N_{HE}^1 . Тогда при оптимизации необходимо определить оптимальное положение тарелки подвода теплоты от парового потока колонны К2 – N_{HE}^2 , степень сжатия E_{comp} , а также оптимальное соотношение первого и второго тепловых потоков Q_{HE}^1 и Q_{HE}^2 .

В данном случае оптимизацию производили посредством комбинации методов последовательного квадратичного программирования и утилиты автоматического перебора *Sensitivity Analysis*, встроенных в программный комплекс Aspen Plus. Результат оптимизации представлен в табл. 8, а оптимальные рабочие параметры – в табл. 9.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенных исследований были рассмотрены четыре различных варианта теплоинтеграции между колоннами схемы ЭР смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с ДМФА в качестве разделяющего агента. Сопоставление предложенных схем неадиабатической ректификации с традиционной схемой ЭР из двух отборных колонн по критерию приведенных энергозатрат представлено в табл. 10. Снижение приведенных энергозатрат ΔQ_{cons} рассчитывали по формуле:

$$\Delta Q_{cons} = (Q_{total} - Q_{cons}) / Q_{total} \times 100\%, \quad (2)$$

где: Q_{total} – суммарные энергетические затраты в кипятильниках колонн традиционной схемы ЭР, а Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией.

Таблица 6. Оптимизация рабочих параметров неадиабатической Схемы III
Table 6. Optimization of operation parameters for diabatic Scheme III

E_{comp}	$\frac{W_{comp}, \text{ кВт}}{W_{comp}, \text{ kW}}$	N_{HE}	$\frac{Q_{HE}, \text{ кВт}}{Q_{HE}, \text{ kW}}$	$\frac{Q_{reb}^{K1}, \text{ кВт}}{Q_{reb}^{K1}, \text{ kW}}$	$\frac{Q_{PH}, \text{ кВт}}{Q_{PH}, \text{ kW}}$	$\frac{Q_{cons}, \text{ кВт}}{Q_{cons}, \text{ kW}}$
3.0	15.2	24	61.7	133.2	0.5	179.3
4.0	19.5	26	75.5	119.3	0.5	178.3
4.3	20.9	27	84.8	109.6	0.5	172.8
4.6	21.7	28	97.4	97.4	0.6	163.1
4.8	26.5	29	114.9	79.6	0.7	159.8
5.0	32.6	30	137.4	55.9	0.8	154.5
5.4	34.3	31	136.5	62.4	0.8	166.1
6.3	37.8	32	134.5	65.5	0.8	179.7

Примечание: E_{comp} – степень сжатия компрессора; W_{comp} – потребляемая мощность компрессора; N_{HE} – номер тарелки подвода тепла в теплообменнике; Q_{HE} – тепловая нагрузка теплообменника; K1 – колонна ЭР; Q_{reb}^{K1} – тепловая нагрузка кипятильника K1; Q_{PH} – тепловая нагрузка в предподогревателе; Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией.

Note: E_{comp} is the compressor compression ratio; W_{comp} is the compressor power consumption; N_{HE} is the heat supply plate number in the heat exchanger; Q_{HE} is the exchanger heat duty; K1 is the extractive distillation column; Q_{reb}^{K1} is the reboiler heat duty in K1; Q_{PH} is the heat duty in the preheater; Q_{cons} is the reduced energy consumption in the scheme with thermal integration.

Таблица 7. Оптимальные рабочие параметры неадиабатической Схемы III

Table 7. Optimal operation parameters for diabatic Scheme III

Параметры Parameters	K1	K2	K3
N_{total}	32	14	44
N_{HE}	30	—	—
Q_{reb} , кВт Q_{reb} , kW	55.9	151	59.3
R	0.50	0.46	1.6
Q_{HE} , кВт Q_{HE} , kW	137.4	—	—
Q_{PH} , кВт Q_{PH} , kW	0.8	—	—
E_{comp}	5.0	—	—
W_{comp} , кВт W_{comp} , kW	32.6	—	—
Q_{cons} , кВт Q_{cons} , kW	365		

Примечание: N_{total} – суммарное число тарелок в колонне; N_{HE} – номер тарелки подвода тепла в теплообменник; Q_{reb} – тепловая нагрузка кипятильника; R – флегмовое число; Q_{HE} – тепловая нагрузка теплообменника; Q_{PH} – тепловая нагрузка в предподогревателе; E_{comp} – степень сжатия компрессора; W_{comp} – потребляемая мощность компрессора; Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией.

Note: N_{total} is the total number of plates in the column; N_{HE} is the heat supply plate number in the heat exchanger; Q_{reb} is the reboiler heat duty; R is the reflux ratio; Q_{HE} is the exchanger heat duty; Q_{PH} is the heat duty in the preheater; E_{comp} is the compressor compression ratio; W_{comp} is the compressor power consumption; Q_{cons} is the reduced energy consumption in the scheme with thermal integration.

Таблица 8. Оптимизация рабочих параметров неадиабатической Схемы IV

Table 8. Optimization of operation parameters for diabatic Scheme IV

E_{comp}	W_{comp} , кВт W_{comp} , kW	N_{HE}^2	Q_{HE}^1 , кВт Q_{HE}^1 , kW	Q_{HE}^2 , кВт Q_{HE}^2 , kW	Q_{reb}^{K1} , кВт Q_{reb}^{K1} , kW	Q_{PH} , кВт Q_{PH} , kW	Q_{cons} , кВт Q_{cons} , kW
3.5	17.4	25	27	35	126	0.8	178
4	19.4	26	16	55	123	0.8	181
4.3	20.5	27	14	76	113	0.8	175
4.6	21.5	28	16	93	99	0.8	164
4.8	24.8	29	13	105	83	0.8	157
5	32.6	30	25	136	31.7	0.8	130
5.4	34.2	31	27	136	37	0.8	140

Примечание: E_{comp} – степень сжатия компрессора; W_{comp} – потребляемая мощность компрессора; N_{HE}^2 – номер тарелки подачи второго потока в теплообменник; Q_{HE}^1 – тепловая нагрузка первого потока в теплообменнике; Q_{HE}^2 – тепловая нагрузка второго потока в теплообменнике; K1 – колонна ЭР; Q_{reb}^{K1} – тепловая нагрузка кипятильника K1; Q_{PH} – тепловая нагрузка в предподогревателе; Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией.

Note: E_{comp} is the compressor compression ratio; W_{comp} is the compressor power consumption; N_{HE}^2 is the second flow plate number in the heat exchanger; Q_{HE}^1 is the first flow heat duty in the heat exchanger; Q_{HE}^2 is the second flow heat duty in the heat exchanger; K1 is the extractive distillation column; Q_{reb}^{K1} is the reboiler heat duty in K1; Q_{PH} is the heat duty in the preheater; Q_{cons} is the reduced energy consumption in the scheme with thermal integration.

Таблица 9. Оптимальные рабочие параметры неадиабатической Схемы IV

Table 9. Optimal operation parameters for diabatic Scheme IV

Параметры Parameters	K1	K2	K3
N_{total}	32	14	44
N_{HE}	24/31	—	—
Q_{reb} , кВт Q_{reb} , kW	31.7	151	59.3
R	0.49	0.46	1.6
Q_{HE} , кВт Q_{HE} , kW	137/25	—	—
Q_{PH} , кВт Q_{PH} , kW	0.8	—	—
E_{comp}	5.0	—	—
W_{comp} , кВт W_{comp} , kW	32.6	—	—
Q_{cons} , кВт Q_{cons} , kW	341		

Примечание: N_{total} – суммарное число тарелок в колонне; N_{HE} – номер тарелки подвода тепла в теплообменнике; Q_{reb} – тепловая нагрузка кипятильника; R – флегмовое число; Q_{HE} – тепловая нагрузка теплообменника; Q_{PH} – тепловая нагрузка в предподогревателе; E_{comp} – степень сжатия компрессора; W_{comp} – потребляемая мощность компрессора; Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией.

Note: N_{total} is the total number of plates in the column; N_{HE} is the heat supply plate number in the heat exchanger; Q_{reb} is the reboiler heat duty; R is the reflux ratio; Q_{HE} is the exchanger heat duty; Q_{PH} is the heat duty in the preheater; E_{comp} is the compressor compression ratio; W_{comp} is the compressor power consumption; Q_{cons} is the reduced energy consumption in the scheme with heat integration.

Таблица 10. Энергетическая эффективность различных вариантов схем ЭР

Table 10. Energy efficiency of various variants of extractive distillation schemes

Параметры Parameters	Схема Scheme				
	Традиц. Convent.	I	II	III	IV
Q_{total} , кВт Q_{total} , kW	410	351	344	266	242
W_{comp} , кВт W_{comp} , kW	0	0	0	32.6	32.6
Q_{cons} , кВт Q_{cons} , kW	410	351	344	365	341
ΔQ_{cons} , %	0	14	16	11	17

Примечание: Q_{total} – суммарные энергетические затраты в кипятильниках колонн традиционной схемы; W_{comp} – потребляемая мощность компрессора; Q_{cons} – приведенные энергозатраты схемы с теплоинтеграцией; ΔQ_{cons} – снижение приведенных энергозатрат схемы с теплоинтеграцией.

Note: Q_{total} is total energy costs in reboilers of the columns in the conventional scheme; W_{comp} is the compressor power consumption; Q_{cons} is the reduced energy consumption in the heat integration scheme; ΔQ_{cons} is the decrease in the reduced energy consumption in the heat integration scheme.

Как можно видеть из табл. 10, максимальное снижение приведенных энергозатрат достигается в Схеме IV. Однако для обеспечения работоспособности Схемы IV требуется применение компрессора с высокой ($E_{\text{comp}} = 5$) степенью сжатия, что может негативно сказаться на стоимости такой установки. В свою очередь, для работы Схем I и II повышение давления потоков, а соответственно, применение дорогостоящего компрессорного оборудования не требуется, при этом снижение энергозатрат по сравнению с традиционной схемой у Схем I и II соизмеримо со Схемой IV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрено применение неадиабатических схем в ЭР смеси ацетон–толуол–*n*-бутанол с ДМФА. Показано, что применение таких схем позволяет снижать приведенные энергетические затраты на 11–17%. При этом максимальное снижение энергозатрат достигается в Схеме IV с использованием компрессора, но эффективность схем без компрессора незначительно ниже, при этом технологическое оформление таких решений существенно проще, что делает их более привлекательными с точки зрения практической реализации. Таким образом, предложена нетрадиционная для процессов ЭР схема внешней теплоинтеграции, использующая в одной или нескольких колоннах неадиабатический процесс. Предлагаемое решение позволяет при

определенных характеристиках разделяемой смеси отказаться от применения тепловых насосов или принудительного повышения давления в отдельных секциях или колоннах схемы в целом.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания РТУ МИРЭА, тема № 0706-2020-0020.

Acknowledgments

The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, the state assignment for RTU MIREA, No. 0706-2020-0020.

Вклад авторов

П.С. Клаузнер – планирование и проведение исследований, анализ материалов исследований, написание текста статьи;

Д.Г. Рудаков – проведение исследований, анализ материалов исследований;

Е.А. Анохина – руководство и научное консультирование;

А.В. Тимошенко – формулировка научной концепции работы, общее руководство.

Authors' contributions

P.S. Klauzner – planning and conducting research, analyzing research materials, writing the manuscript;

D.G. Rudakov – conducting research, analyzing research materials;

E.A. Anokhina – management and scientific consulting;

A.V. Timoshenko – formulation of the scientific concept, general management.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Фролкова А.К. *Разделение азеотропных смесей: физико-химические основы и технологические приемы*. М.: Владос; 2010. 192 с. ISBN 978-5-691-01743-8

[Frolkova A.K. *Razdelenie azeotropnykh smesei: Fiziko-khimicheskie osnovy i tekhnologicheskie priemy (Separation of Azeotropic Mixtures: Physical and Chemical Principles and Techniques)*. Moscow: Vlados; 2010. 192 p. (in Russ.). ISBN 978-5-691-01743-8]

2. Анохина Е.А. Энергосбережение в процессах экстрактивной ректификации. *Вестник МИТХТ (Тонкие химические технологии)*. 2013;8(5):3–19.

[Anokhina E.A. Energy saving in extractive distillation. *Tonk. Khim. Technol. = Fine Chem. Technol.* 2013;8(5):3–19 (in Russ.).]

3. Gerbaud V., Rodriguez-Donis I., Hegelyc L., Lange P., Denis F., Youe X. Q. Review of extractive distillation. Process design, operation, optimization and control. *Chem. Eng. Res. Des.* 2019;144:229–271. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.09.020>

4. Chen D., Yuan X., Xu L., Yu K. T. Comparison between Different Configurations of Internally and Externally Heat-Integrated Distillation by Numerical Simulation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013;52(16):5781–5790. <https://doi.org/10.1021/ie400112k>

5. Palacios-Bereche R., Ensinas A.V., Modesto M., Nebra S.A. Double-effect distillation and thermal integration applied to the ethanol production process. *Energy*. 2015;82:512–523. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.01.062>
6. Wang C., Guang C., Cui Y., Wang C., Zhang Z. Compared novel thermally coupled extractive distillation sequences for separating multi-azeotropic mixture of acetonitrile/benzene/methanol. *Chem. Eng. Res. Des.* 2018;136:513–528. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.06.017>
7. Gutierrez-Guerra R., Segovia-Hernández J.G., Hernandez S., Bonilla-Petriciolet A., Hernández H. Design and Optimization of Thermally Coupled Extractive Distillation Sequences. *Comput. Aided Chem. Eng.* 2009;26:189–194. [https://doi.org/10.1016/S1570-7946\(09\)70032-X](https://doi.org/10.1016/S1570-7946(09)70032-X)
8. Yang A., Sy Y., Chien I.L., Jin S., Yan C., Wei S., Shen W., et al. Investigation of an energy-saving double-thermally coupled extractive distillation for separating ternary system benzene/toluene/cyclohexane. *Energy*. 2019;186:115756. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.07.086>
9. Anokhina E.A., Timoshenko A.V., Akishin A.Y., Remizova A.V. Benzene purification from thiophene using dimethylformamide as an entrainer in thermally coupled extractive distillation columns. *Chem. Eng. Res. Des.* 2019;146:391–403. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.04.003>
10. Anokhina E., Timoshenko A. Criterion of the energy effectiveness of extractive distillation in the partially thermally coupled columns. *Chem. Eng. Res. Des.* 2015;99:165–175. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.03.006>
11. Hernández S. Analysis of energy-efficient complex distillation options to purify bioethanol. *Chem. Eng. Technol.* 2008;31(4):597–603. <https://doi.org/10.1002/ceat.200700467>
12. Gutiérrez-Guerra R., Segovia-Hernández J.G., Hernández S. Reducing energy consumption and CO₂ emissions in extractive distillation. *Chem. Eng. Res. Des.* 2009;87(2):145–152. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2008.07.004>
13. You X., Rodriguez-Donis I., Gerbaud V. Improved design and efficiency of the extractive distillation process for acetone–methanol with water. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2015;54(1):491–501. <https://doi.org/10.1021/ie503973a>
14. Zhang X., Li X., Li G., Zhu Z., Wang Y., Xu D. Determination of an optimum entrainer for extractive distillation based on an isovolatility curve at different pressures. *Sep. Purif. Technol.* 2018;201:79–95. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.03.007>
15. Luyben W.L. Control of heat-integrated extractive distillation processes. *Comput. Chem. Eng.* 2018;111:267–277. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2017.12.008>
16. Xu Y., Li J., Ye Q., Li Y. Design and optimization for the separation of tetrahydrofuran/isopropanol/water using heat pump assisted heat-integrated extractive distillation. *Sep. Purif. Technol.* 2021;277:119498. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119498>
17. Xu Y., Li J., Ye Q., Li Y. Energy efficient extractive distillation process assisted with heat pump and heat integration to separate acetonitrile/1,4-dioxane/water. *Process Saf. Environ. Prot.* 2021;156:144–159. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.09.042>
18. Klauzner P.S., Rudakov D.G., Anokhina E.A., Timoshenko A.V. Use of Partially Thermally Coupled Distillation Systems and Heat Pumps for Reducing the Energy Consumption in the Extractive Distillation of an Isobutanol–Isobutyl Acetate Mixture Using Dimethylformamide. *Theor. Found. Chem. Eng.* 2020;54(3):397–406. <https://doi.org/10.1134/S0040579520030070>
19. You X., Rodriguez-Donis I., Gerbaud V. Reducing process cost and CO₂ emissions for extractive distillation by double-effect heat integration and mechanical heat pump. *Appl. Energy*. 2016;166:128–140. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.01.028>
20. Mah R.S., Nicholas J.J., Wodnik R.B. Distillation with secondary reflux and vaporization: A comparative evaluation. *AIChE J.* 1977;23(5):651–658. <https://doi.org/10.1002/aic.690230505>
21. Jana A.K. Heat integrated distillation operation. *Appl. Energy*. 2010;87(5):1477–1494. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.10.014>
22. Kiss A.A., Olujić Ž. A review on process intensification in internally heat-integrated distillation columns. *Chem. Eng. Process.* 2014;86:125–144. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2014.10.017>
23. Naito K., Nakaiwa M., Huang K., Endo A., Aso K., Nakanishi T., et al. Operation of a bench-scale ideal heat integrated distillation column (HIDiC): An experimental study. *Comput. Chem. Eng.* 2000;24(2–7):495–499. [https://doi.org/10.1016/S0098-1354\(00\)00513-5](https://doi.org/10.1016/S0098-1354(00)00513-5)
24. Gadalla M., Jimenez L., Olujić Z., Jansens P.J. A thermohydraulic approach to conceptual design of an internally heat-integrated distillation column (i-HIDiC). *Comput. Chem. Eng.* 2007;31(10):1346–1354. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2006.11.006>
25. Hugill J.A., Hugill A., Anthony H.J. *System for stripping and rectifying a fluid mixture*: World Pat. WO2003011418-A. Publ. 13.02.2003.
26. Nakaiwa M., Huang K., Owa M., Akiya T., Nakane T., Takamatsu T. Operating an ideal heat integrated distillation column with different control algorithms. *Comput. Chem. Eng.* 1998;22(Suppl. 1):389–393. [https://doi.org/10.1016/S0098-1354\(98\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0098-1354(98)00079-9)
27. Nova-Rincón A., Ramos M.A., Gómez J.M. Simultaneous optimal design and operation of a diabatic extractive distillation column based on exergy analysis. *Int. J. Exergy*. 2015;17(3):287–312. <https://doi.org/10.1504/IJEX.2015.070500>
28. Aurangzeb Md., Jana A.K. Vapor recompression with interboiler in a ternary dividing wall column: Improving energy efficiency and savings, and economic performance. *Appl. Therm. Eng.* 2018;147:1009–1023. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2018.11.008>

Об авторах:

Клаузнер Павел Сергеевич, к.т.н., ассистент кафедры химии и технологии основного органического синтеза Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: klauzner@mirea.ru. ResearcherID AAJ-7842-2021, SPIN-код РИНЦ 6922-6509, <https://orcid.org/0000-0001-5844-549X>

Рудаков Данила Григорьевич, к.т.н., доцент кафедры химии и технологии основного органического синтеза Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: rudakov@mirea.ru. Scopus Author ID 37018548000, ResearcherID M-5241-2014, SPIN-код РИНЦ 2366-9449, <https://orcid.org/0000-0002-9892-7909>

Анохина Елена Анатольевна, д.т.н., профессор кафедры химии и технологии основного органического синтеза Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: anokhina.ea@mail.ru. Scopus Author ID 6701718055, ResearcherID E-5022-2016, SPIN-код РИНЦ 8161-7762

Тимошенко Андрей Всеволодович, д.т.н., профессор кафедры химии и технологии основного органического синтеза Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: timoshenko@mirea.ru. Scopus Author ID 56576076700, ResearcherID Y-8709-2018, SPIN-код РИНЦ 5687-7930, <https://orcid.org/0000-0002-6511-7440>

About the authors:

Pavel S. Klauzner, Cand. Sci. (Eng.), Assistant, Department of Chemistry and Technology of Basic Organic Synthesis, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: klauzner@mirea.ru. ResearcherID AAJ-7842-2021, RSCI SPIN-code 6922-6509, <https://orcid.org/0000-0001-5844-549X>

Danila G. Rudakov, Cand. Sci. (Eng.), Associate Professor, Department of Chemistry and Technology of Basic Organic Synthesis, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: rudakov@mirea.ru. Scopus Author ID 37018548000, ResearcherID M-5241-2014, RSCI SPIN-code 2366-9449, <https://orcid.org/0000-0002-9892-7909>

Elena A. Anokhina, Dr. Sci. (Eng.), Professor, Department of Chemistry and Technology of Basic Organic Synthesis, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: anokhina.ea@mail.ru. Scopus Author ID 6701718055, ResearcherID E-5022-2016, RSCI SPIN-code 8161-7762

Andrey V. Timoshenko, Dr. Sci. (Eng.), Professor, Department of Chemistry and Technology of Basic Organic Synthesis, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: timoshenko@mirea.ru. Scopus Author ID 56576076700, ResearcherID Y-8709-2018, RSCI SPIN-code 5687-7930, <https://orcid.org/0000-0002-6511-7440>

*Поступила: 09.08.2022; получена после доработки: 26.09.2022; принята к опубликованию: 30.01.2023.
The article was submitted: August 09, 2022; approved after reviewing: September 26, 2022; accepted for publication: January 30, 2023.*

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ORGANIC SUBSTANCES

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-21-28>

УДК 547.464.7



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

**Конденсация вторичных аминов с СН-кислотами
и формальдегидом под действием микроволнового излучения**

А.И. Мусин¹, Д.С. Султанова¹, Ю.Г. Борисова^{1,✉}, Т.П. Мудрик², Р.Р. Даминев¹

¹Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, 450064 Россия

²Центр оценки качества зерна, Уфа, 450097 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: yulianna_borisova@mail.ru

Аннотация

Цели. Синтезировать по реакции Манниха третичные амины, содержащие гем-дихлорциклопропановый или 1,3-диоксолановый фрагмент, а также получить этиловый эфир β-аминопропионовой кислоты декарбоксилированием трет-амина – производного диэтилмалоната, содержащего гем-дихлорциклопропановый фрагмент.

Методы. Для получения третичных аминов по реакции Манниха был использован метод микроволновой активации. Для определения качественного и количественного состава реакционных масс были использованы следующие методы анализа: газовая хроматография, масс-спектрометрия с электронной ионизацией, и ¹H-, ¹³C-спектрометрия ядерного магнитного резонанса.

Результаты. Третичные амины, содержащие гем-дихлорциклопропановый или 1,3-диоксолановый фрагмент, синтезированы конденсацией вторичных аминов, СН-кислот и параформальдегида в условиях микроволнового излучения.

Выводы. С высокими выходами в условиях микроволнового излучения получены третичные амины, содержащие в своем строении гем-дихлорциклопропановый или циклоацетальный фрагмент.

Ключевые слова: вторичные амины, СН-кислота, микроволновое излучение

Для цитирования: Мусин А.И., Султанова Д.С., Борисова Ю.Г., Мудрик Т.П., Даминев Р.Р. Конденсация вторичных аминов с СН-кислотами и формальдегидом под действием микроволнового излучения. *Тонкие химические технологии*. 2023;18(1):21–28. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-21-28>

RESEARCH ARTICLE

Condensation of secondary amines with CH-acids and formaldehyde under the influence of microwave radiation

Airat I. Musin¹, Dilara S. Sultanova¹, Yulianna G. Borisova^{1,✉}, Tatyana P. Mudrik², Rustem R. Daminev¹

¹Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, 450064 Russia

²Center for Grain Quality Assessment, Ufa, 450097 Russia

✉Corresponding author, e-mail: yulianna_borisova@mail.ru

Abstract

Objectives. To synthesize tertiary amines containing gem-dichlorocyclopropane or 1,3-dioxolane fragment using the Mannich reaction, as well as obtain ethyl ester of β -aminopropionic acid by decarboxylation of tert-amine, a derivative of diethylmalonate containing a gem-dichlorocyclopropane fragment.

Methods. In order to obtain tertiary amines by the Mannich reaction, the microwave activation method was used. To determine the qualitative and quantitative composition of the reaction masses, gas chromatography, electron ionization mass spectrometry, and ^1H -, ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectrometry methods were used.

Results. Under microwave radiation conditions, tertiary amines containing gem-dichlorocyclopropane or 1,3-dioxolane fragment were synthesized by condensation of secondary amines, CH-acids, and paraformaldehyde.

Conclusions. Tertiary amines containing a gem-dichlorocyclopropane or cycloacetal fragment in their structure were obtained in high yields under microwave radiation.

Keywords: secondary amines, CH-acid, microwave radiation

For citation: Musin A.I., Sultanova D.S., Borisova Yu.G., Mudrik T.P., Daminev R.R. Condensation of secondary amines with CH-acids and formaldehyde under the influence of microwave radiation. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):21–28 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-21-28>

ВВЕДЕНИЕ

Полифункциональные вторичные и третичные амины широко используются в синтезе биологически активных и лекарственных препаратов [1–3]. В частности, для получения вторичных и третичных аминов с карбонильными или сложноэфирными заместителями успешно используется трехкомпонентная конденсация соответствующих аминов с формальдегидом и с соединениями, содержащими подвижный атом водорода [4, 5]. В качестве таких соединений используют, как правило, алкилфенолы, диалкилфосфиты, 1,3-карбонильные соединения и другие СН-кислоты [6, 7].

Ранее нами было показано, что вещества, содержащие gem-дихлорциклопропановый или

циклоацетальный фрагмент, проявляют широкий спектр биологической активности и их синтез представляет значительный интерес [8, 9].

В этой связи, мы изучили конденсацию вторичных аминов, содержащих gem-дихлорциклопропановый или циклоацетальный фрагмент, с формальдегидом и СН-кислотами, диэтилмалонатом и ацетоуксусным эфиром.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ реакционных масс и запись масс-спектров соединений осуществляли на аппаратно-программном комплексе «Хроматэк-Кристалл 5000М» (Хроматэк, Россия) с установленной базой NIST 2020 (National Institute

of Standards and Technology, США). Условия газохроматографического (ГХ) анализа: капиллярная кварцевая колонка длиной 30 м, длительность анализа – 20 мин, температура источника ионов – 260 °С, температура переходной линии – 300 °С, диапазон сканирования – 30–300 Да, давление – 37–43 мТорр, газ-носитель – гелий, скорость нагрева – 20 °С/мин. Для получения масс-спектров соединений использовали метод ионизации электронным ударом с потенциалом ионизации 70 эВ. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре «Bruker AM-500» (Bruker, Германия) с рабочими частотами 500 и 125 МГц соответственно; растворитель – CDCl_3 . Химические сдвиги приведены по шкале δ (м.д.) относительно тетраметилсилана как внутреннего стандарта. Константы спин-спинового взаимодействия (J) приведены в Гц.

Микроволновая активация осуществлялась с использованием системы «Mars 6» (CEM Corporation, США) с системой контроля температуры.

Параметры установки микроволнового излучения (МВИ): мощность излучения 1000 Вт; объем реакционной массы до 100 мл; выдерживаемое давление до 100 атм; программирование температуры от 35 °С до 280 °С.

Вторичные амины **IIIa** и **IIIб** были получены по известной методике [10, 11].

Синтез трет-аминов **IVa**, **IVб**, **Va**, **Vб**

Смесь 0.15 моль СН-кислоты, 0.15 моль параформа, 1 моль бензола, 0.1 моль вторичного амина перемешивали в условиях МВИ при температуре не более 60 °С до полной конверсии исходного амина (2–6 ч, контроль методом ГХ). По окончании реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, отмывали водой, экстрагировали хлористым метиленом, осушали хлоридом кальция и упаривали. Целевые соединения выделяли вакуумной перегонкой.

Диэтил ((бутил[(2,2-дихлор-1-метил-циклопропил)метил]амино)метил)малонат **IVa**. Бесцветная вязкая жидкость. $T_{\text{кип.}} = 138\text{--}140$ °С (1 мм рт. ст.). Выход 90%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.90 (т, 3Н, CH_3 , $J = 12.7$ Гц), 1.01 (т, 2Н, CH_2 , $J = 8$ Гц), 1.22 (т, 6Н, 2 CH_3 , $J = 6.9$ Гц), 1.25 (с, 3Н, CH_3), 1.71–1.83 (м, 4Н, 2 CH_2), 1.91–1.96 (м, 2Н, CH_2), 2.41 (т, 2Н, CH_2 , $J = 6.1$ Гц), 2.61 (т, 2Н, CH_2 , $J = 10.7$ Гц), 3.66 (т, 1Н, CH , $J = 9.5$ Гц), 4.25 (кв, 4Н, 2 CH_2 , $J = 11.8$; 7.4 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 14.1 (2 CH_3), 14.38 (CH_3), 21.45 (CH_3), 27.66 (CH_2), 29.34 (CH_2), 41.55 (CH), 57.15 (CH_2), 62.25 (2 CH_2), 64.76 (CH_2), 64.99 (CH_2), 66.82 (CH_2), 66.99 (C), 171.01 (C=O).

Масс-спектр m/z , ($I_{\text{отн.}}$, %): (282)/(30), (254/256)/(10/5), (238/240)/(40/20), (186)/(15), (170)/(30), (128)/(60), (109/111/113)/(50/30/12).

Диэтил ((бутил[(2-(1,3-диоксолан-2-ил)этил]-амино)метил)малонат **IVб**. Бесцветная вязкая жидкость. $T_{\text{кип.}} = 125\text{--}127$ °С (1 мм рт. ст.). Выход 88%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.92 (т, 3Н, CH_3 , $J = 12.7$ Гц), 1.26 (т, 6Н, 2 CH_3 , $J = 6.9$ Гц), 1.67–1.74 (м, 4Н, 2 CH_2), 1.88–1.91 (м, 2Н, CH_2), 2.48–2.63 (м, 6Н, 3 CH_2), 3.66 (т, 1Н, CH , $J = 9.5$ Гц), 3.84 (т, 2Н, CH_2 , $J = 6.2$ Гц), 3.98 (т, 2Н, CH_2 , $J = 6.3$ Гц), 4.20 (кв, 4Н, 2 CH_2 , $J = 11.8$; 7.4 Гц), 5.01 (д, 1Н, CH , $J = 6$ Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 13.84 (2 CH_3), 14.42 (CH_3), 21.38 (CH_2), 28.22 (CH_2), 32.11 (CH_2), 41.89 (CH), 54.77 (CH_2), 55.29 (CH_2), 56.43 (CH_2), 63.18 (2 CH_2), 66.77 (2 CH_2), 103.27 (CH), 170.66 (C=O).

Масс-спектр m/z , ($I_{\text{отн.}}$, %): (345)/(14), (282)/(40), (238)/(70), (173)/(40), (86)/(30), (129)/(60), (73)/(100).

Этил 2-((бутил[(2,2-дихлор-1-метил-циклопропил)метил]амино)метил)-3-оксобутаноат **Va**. Бесцветная вязкая жидкость. $T_{\text{кип.}} = 131\text{--}133$ °С (1 мм рт. ст.). Выход 85%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.89 (т, 3Н, CH_3 , $J = 12.7$ Гц), 0.95 (т, 2Н, CH_2 , $J = 10$ Гц), 1.22 (т, 3Н, CH_3 , $J = 6.0$ Гц), 1.44 (т, 3Н, CH_3 , $J = 6.3$ Гц), 1.69–1.77 (м, 4Н, 2 CH_2), 2.41 (с, 3Н, CH_3), 2.63 (т, 2Н, CH_2 , $J = 9.5$ Гц), 2.78 (т, 2Н, CH_2 , $J = 7$ Гц), 2.98 (т, 2Н, CH_2 , $J = 7.8$ Гц), 3.78 (т, 1Н, CH , $J = 9.1$ Гц), 4.33 (кв, 2Н, CH_2 , $J = 11.0$; 7.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 14.1 (CH_3), 14.38 (CH_3), 21.45 (CH_3), 21.66 (CH_2), 28.31 (CH_3), 27.48 (CH_2), 51.84 (CH), 57.17 (CH_2), 63.33 (CH_2), 65.94 (CH_2), 65.98 (C), 66.39 (CH_2), 66.85 (CH_2), 171.01 (C=O), 201.66 (C=O).

Масс-спектр m/z , ($I_{\text{отн.}}$, %): (295/297/299)/(21/16/8), (165/167/169)/(70/45/15), (123/125/127)/(45/23/10), (89/91)/(80/35), (51/66).

Диэтил ((бутил[(2-(1,3-диоксолан-2-ил)этил]-амино)метил)-3-оксобутаноат **Vб**. Бесцветная жидкость. $T_{\text{кип.}} = 122\text{--}123$ °С (1 мм рт. ст.). Выход 83%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.85 (т, 3Н, CH_3 , $J = 12$ Гц), 1.22 (т, Н, CH_3 , $J = 6.7$ Гц), 1.43–1.58 (м, 4Н, 2 CH_2), 1.77–1.83 (м, 2Н, CH_2), 2.14–2.20 (м, 4Н, 2 CH_2), 2.38 (т, 3Н, CH_3 , $J = 8$ Гц), 2.46 (т, 2Н, CH_2 , $J = 9$ Гц), 3.78 (т, 1Н, CH , $J = 9$ Гц), 3.86 (т, 2Н, CH_2 , $J = 6.0$ Гц), 3.90 (т, 2Н, CH_2 , $J = 6.0$ Гц), 4.24 (кв, 2Н, CH_2 , $J = 11.6$; 7.0 Гц), 5.00 (д, 1Н, CH , $J = 6.2$ Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 13.55 (CH_3), 14.58 (CH_3), 21.40 (CH_2), 27.78 (CH_2), 28.67 (CH_3), 32.11 (CH_2), 54.43 (CH_2), 54.77 (CH_2), 55.29 (CH_2), 59.34 (CH), 63.18 (CH_2), 66.77 (2 CH_2), 103.27 (CH), 170.61 (C=O), 201.60 (C=O).

Масс-спектр m/z , ($I_{\text{отн.}}$, %): (314)/(3), (244)/(50), (169)/(60), (128)/(60), (87)/(40), (73)/(100).

Синтез этилового эфира β -аминопропионовой кислоты VI

Смесь 0.1 моль соединения IVa, 0.3 моль хлорида лития, 0.3 моль ДМСО, 0.2 моль воды нагревали при перемешивании до 150 °С в течение 1 ч до полной конверсии исходного соединения (контроль по ГХ). По окончании реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, отмывали водой, экстрагировали хлористым метиленом, осушали хлоридом кальция и упаривали.

Этил *N*-бутил-*N*-[(2,2-дихлороциклопропил)-метил]- β -аланинат VI. Бесцветная жидкость. $T_{\text{кип.}} = 115\text{--}117$ °С (1 мм рт. ст.). Выход 88%. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.98 (т, 3H, CH_3 , $J = 7.9$ Гц), 1.21 (т, 3H, CH_3 , $J = 8.1$ Гц), 1.26 (с, 3H, CH_3), 1.38 (кв, 2H, CH_2 , $J = 13; 8$ Гц), 1.51–1.66 (м, 4H, 2 CH_2), 2.71 (д, 2H, CH_2 , $J = 6.9$ Гц), 2.76 (м, 4H, 2 CH_2), 3.66 (д, 1H, CH_a , $J = 8.2$ Гц),

3.71 (д, 1H, CH_b , $J = 8$ Гц), 4.10 (кв, CH_2 , $J = 11; 8$ Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 14.8 (CH_3), 15.1 (CH_3), 21.8 (CH_3), 26.3 (CH_2), 38.1 (CH_2), 51.0 (CH_2), 53.2 (CH_2), 58.7 (CH_2), 62.5 (CH_2), 69.3 (CH_2), 70.1 (CH_2), 171.1 (C=O).

Масс-спектр m/z , ($I_{\text{отн.}}$, %): (275/277/279)/(21/16/8), (165/167/169)/(70/45/15), (139/141/143)/(100/50/10), (123/125/127)/(65/42/18), (89/91)/(80/40).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате трехкомпонентной конденсации СН-кислот I, II с параформальдегидом и вторичными аминами IIIa и IIIб были получены третичные амины IVa, IVб, Va и Vб с выходами 2–5%. Повышение температуры в интервале 80–120 °С и продолжительности реакции до 25 ч к увеличению выхода целевых аминов IVa, IVб, Va и Vб не привели (Схема 1).

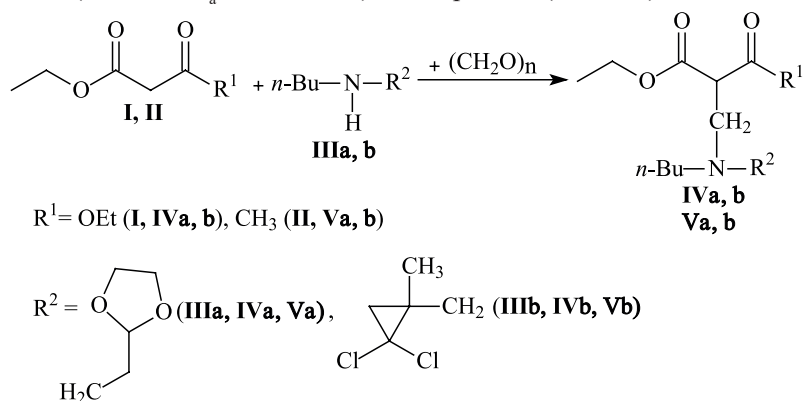


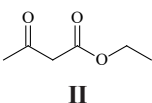
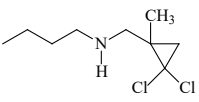
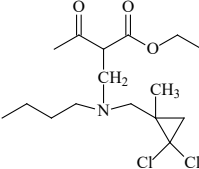
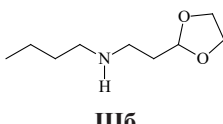
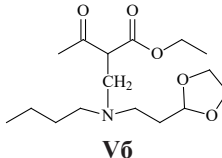
Схема 1. Конденсация СН-кислот, вторичных аминов и параформа.

Scheme 1. Condensation of CH-acids, secondary amines, and paraformaldehyde.

Таблица. Конденсация вторичных аминов с формальдегидом и СН-кислот под действием термического нагрева и МВИ
Table. Condensation of secondary amines with formaldehyde and CH-acids under the action of thermal heating and microwave radiation (MWR)

Реагенты Reagents		Продукт Product	Выход продукта реакции Reaction product yield	
СН-кислота CH-acid	Вторичный амин Secondary amine		Длительность термического нагрева, ч Duration of thermal heating, h	Длительность МВИ, мин Duration of MWR, min
I	IIIa	IVa	3–5	90
	IIIб	IVб	3–5	88

Таблица. Продолжение
Table. Continued

Реагенты Reagents		Продукт Product	Выход продукта реакции Reaction product yield	
СН-кислота CH-acid	Вторичный амин Secondary amine		Длительность термического нагрева, ч Duration of thermal heating, h	Длительность МВИ, мин Duration of MWR, min
 II	 IIIa	 IVa	≤3	85
	 IIIб	 IVб		83

Примечание: Соотношение СН-кислота : амин : параформальдегид = 2 : 1 : 1; продолжительность (ч) термического нагрева/МВИ = 20–25 : 2–6; температура процесса (°С) термического нагрева/МВИ = 100 : 60; конверсия амина (%) после термического нагрева/МВИ = ≤5 : 90.

Note: CH-acid : amine : paraformaldehyde ratio = 2 : 1 : 1; duration (h) of thermal heating/MWR = 20–25 : 2–6; process temperature (°C) thermal heating/MWR = 100 : 60; amine conversion (%) following thermal heating/MWR = ≤5 : 90.

Для стимулирования конденсации (таблица) мы использовали МВИ, как это было описано ранее для реакции аминоалкоголей с формальдегидом и диэтилфосфитом [12, 13].

При этом удалось понизить продолжительность реакции до 2–6 ч, температуру проведения процесса до 60 °С и повысить конверсию аминов IIIa и IIIб до 90% с селективностью образования целевых продуктов IVa, IVб, Va и Vб равной 75–95%.

Из полученных результатов следует, что при переходе от диэтилмалоната I к ацетоуксусному эфиру II селективность образования трет-аминов IVa, IVб, Va и Vб снижается.

Исходные вторичные амины IIIa, IIIб, содержащие гем-дихлорциклопропановый и циклоацетальный фрагмент, по активности в данной реакции практически не отличаются.

Замена апротонного растворителя (бензол) на органические кислоты (уксусную или пропионовую) или их эфиры приводили к резкому снижению селективности образования трет-аминов IVa, IVб, Va и Vб.

Полученный на основе диэфира I и вторичного амина IIIa аддукт IVa был декарбоксилирован (Схема 2) по ранее использованной методике [14, 15].

Этиловый эфир β-аминопропионовой кислоты VI был выделен с выходом 88%.

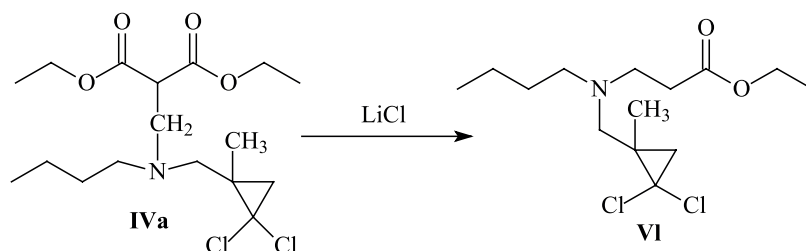


Схема 2. Декарбоксилирование трет-амина IVa.
Scheme 2. Decarboxylation of tert-amine IVa.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Под действием микроволнового излучения, в отличие от термического нагрева, при котором данная реакция осуществима с крайне низким выходом целевого продукта, вторичные амины, содержащие *гем*-дихлорциклопропановый и циклоацетальный фрагменты, конденсируются с параформальдегидом и СН-кислотами с образованием соответствующих *трет*-аминов. Декарбоксилирование *трет*-амина с двумя сложноэфирными группами и содержащего *гем*-дихлорциклопропановый фрагмент, приводит к этиловому эфиру β -аминопропионовой кислоты.

Благодарности

Исследования выполнены при финансовой поддержке программы «Приоритет 2030».

Acknowledgments

The study was supported by the Priority 2030 program.

Вклад авторов

А.И. Мусин – проведение исследований;

Д.С. Султанова – обзор публикаций по теме статьи;

Ю.Г. Борисова – сбор и обработка материала, написание текста статьи;

Т.П. Мудрик – консультации по вопросам планирования;

Р.Р. Даминев – разработка концепции научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Authors' contributions

A.I. Musin – conducting research;

D.S. Sultanova – reviewing publications on the topic of the article;

Yu.G. Borisova – collection and processing of the material and writing the text of the article;

T.P. Mudrik – consultation on planning;

R.R. Daminev – development of the concept of scientific work, critical revision with the introduction of valuable intellectual content.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьмина У.Ш., Раскильдина Г.З., Ишметова Д.В., Сахабутдинова Г.Н., Джумаев Ш.Ш., Борисова Ю.Г., Вахитова Ю.В., Злотский С.С. Цитотоксическая активность гетероциклических соединений, содержащих *гем*-дихлорциклопропановый и/или 1,3-диоксациклоалкановый фрагменты, в отношении клеток линии SH-SY5Y. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(12):27–32. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2021-55-12-27-32>
2. Stanislawski P.C., Willis A.C., Banwell M.G. *gem*-Dihalocyclopropanes as building blocks in natural-product synthesis: enantioselective total syntheses of *ent*-erythramine and 3-*epi*-erythramine. *Chem. Asian J.* 2007;2(9):1127–1136. <https://doi.org/10.1002/asia.200700155>
3. Genta M.T., Villa C., Mariani E., Loupy A., Petit A., Rizzetto R., Mascarotti A., Morini F., Ferro M. Microwave-assisted preparation of cyclic ketals from a cineole ketone as potential cosmetic ingredients: solvent-free synthesis, odour evaluation, *in vitro* cytotoxicity and antimicrobial assays. *Int. J. Pharm.* 2002;231(1):11–20. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00821-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00821-3)
4. Elshan N.G.R.D., Rettig M.B., Jung M.E. Synthesis of β -amino diaryldienones using the Mannich reaction. *Org. Lett.* 2019;21(11):4039–4043. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b01195>

REFERENCES

1. Kuz'mina U.S., Raskil'dina G.Z., Ishmetova D.V., *et al.* Cytotoxic activity against SH-SY5Y neuroblastoma cells of heterocyclic compounds containing *gem*-dichlorocyclopropane and/or 1,3-dioxacycloalkane fragments *Pharm. Chem. J.* 2022;55(12):1293–1298. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02574-6>
[Original Russian Text: Kuz'mina U.S., Raskil'dina G.Z., Ishmetova D.V., *et al.* Cytotoxic activity against SH-SY5Y neuroblastoma cells of heterocyclic compounds containing *gem*-dichlorocyclopropane and/or 1,3-dioxacycloalkane fragments. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2021;55(12):27–32 (in Russ.). <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2021-55-12-27-32>]
2. Stanislawski P.C., Willis A.C., Banwell M.G. *gem*-Dihalocyclopropanes as building blocks in natural-product synthesis: enantioselective total syntheses of *ent*-erythramine and 3-*epi*-erythramine. *Chem. Asian J.* 2007;2(9):1127–1136. <https://doi.org/10.1002/asia.200700155>
3. Genta M.T., Villa C., Mariani E., Loupy A., Petit A., Rizzetto R., Mascarotti A., Morini F., Ferro M. Microwave-assisted preparation of cyclic ketals from a cineole ketone as potential cosmetic ingredients: solvent-free synthesis, odour evaluation, *in vitro* cytotoxicity and antimicrobial assays. *Int. J. Pharm.* 2002;231(1):11–20. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00821-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00821-3)

5. Jin Y., Su G., Yu J. Mannich reaction as a key strategy for the synthesis of trifluoroethyl derived tertiary and secondary amine. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2021;42(6):836–839. <https://doi.org/10.1002/bkcs.12293>
6. Gul H.I., Tugrak M., Gul M., Mazlumoglu S., Sakagami H., Gulcin I., *et al.* New phenolic Mannich bases with piperazines and their bioactivities. *Bioorg. Chem.* 2019;90:103057. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103057>
7. Robertson G.P., Farley A.J., Dixon D.J. Bifunctional Iminophosphorane Catalyzed Enantioselective Ketimine Phospha-Mannich Reaction. *Synlett.* 2015;27(01):21–24. <http://doi.org/10.1055/s-0035-1560530>
8. Раскильдина Г.З., Борисова Ю.Г., Нурланова С.Н., Баширов И.И., Фахретдинова А.К., Пурыгин П.П., Злотский С.С., Зарубин Ю.П. Антикоагуляционная и антиагрегационная активности ряда замещенных гем-дихлорциклопропанов и 1,3-диоксациклоалканов. *Бутлеровские сообщения.* 2022;70(5):86–91.
9. Хуснутдинова Н.С., Сахбугдинова Г.Н., Раскильдина Г.З., Мещерякова С.А., Злотский С.С., Султанова Р.М. Синтез и цитотоксическая активность сложных эфиров дитерпеновых кислот, содержащих циклоацетальный фрагмент. *Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология.* 2022;65(4):6–12. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226504.6516>
10. Валиев В.Ф., Раскильдина Г.З., Злотский С.С. Синтез третичных аминов, содержащих гем-дихлорциклопропановый и циклоацетальный фрагменты. *Журн. прикладной химии.* 2016;89(5):619–623.
11. Тимофеева С.А., Раскильдина Г.З., Спирихин Л.В., Злотский С.С. Синтез аминопроизводных 1,2,5-триазинов, содержащих гетеро- и карбоциклический фрагменты. *Журн. прикладной химии.* 2012;85(2):250–254.
12. Tajti Á., Szatmári E., Perdih F., Keglevich G., *et al.* Microwave-assisted Kabachnik–Fields reaction with amino alcohols as the amine component. *Molecules.* 2019;24(8):1640. <https://doi.org/10.3390/molecules24081640>
13. Tajti Á., Tóth N., Rávai B., Csontos I., *et al.* Study on the microwave-assisted batch and continuous flow synthesis of *N*-alkyl-isoinдолin-1-one-3-phosphonates by a special Kabachnik–Fields condensation. *Molecules.* 2020;25(14):3307. <https://doi.org/10.3390/molecules25143307>
14. Borisova Yu.G., Raskildina G.Z., Zlotsky S.S. Synthesis of *gem*-dichlorocyclopropylmethylmalonates and decarboxylation. *Roumanian J. Chem.* 2016;61(1):29–33.
15. Алиева Р.М., Сунагатуллина А.Ш., Шахмаев Р.Н., Зорин В.В. Синтез (Е)- и (Z)- изомеров 2-(3-хлорпроп-2-ен-1-ил)циклопентанона. *Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология.* 2017;60(4):22–25. <https://doi.org/10.6060/tcct.2017604.5499>
4. Elshan N.G.R.D., Rettig M.B., Jung M.E. Synthesis of β -amino diaryldienones using the Mannich reaction. *Org. Lett.* 2019;21(11):4039–4043. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b01195>
5. Jin Y., Su G., Yu J. Mannich reaction as a key strategy for the synthesis of trifluoroethyl derived tertiary and secondary amine. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2021;42(6):836–839. <https://doi.org/10.1002/bkcs.12293>
6. Gul H.I., Tugrak M., Gul M., Mazlumoglu S., Sakagami H., Gulcin I., *et al.* New phenolic Mannich bases with piperazines and their bioactivities. *Bioorg. Chem.* 2019;90:103057. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103057>
7. Robertson G.P., Farley A.J., Dixon D.J. Bifunctional Iminophosphorane Catalyzed Enantioselective Ketimine Phospha-Mannich Reaction. *Synlett.* 2015;27(01):21–24. <http://doi.org/10.1055/s-0035-1560530>
8. Raskil'dina G.Z., Borisova Yu.G., Nurlanova S.N., *et al.* Anticoagulation and antiaggregation activities of a number of substituted *gem*-dichlorocyclopropanes and 1,3-dioxacycloalkanes. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Comm.* 2022;70(5):86–91 (in Russ.).
9. Sultanova R.M., Sakhabutdinova G.N., Raskil'dina G.Z., Zlotsky S.S., Khusnutdinova N.S., Meshcheryakova S.A. Synthesis and biological activity of diterpenic acids ester containing a cycloacetal fragment. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Seriya Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya = ChemChemTech.* 2022;65(4):6–12 (in Russ.). <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226504.6516>
10. Raskil'dina G.Z., Valiev V.F., Zlotskii S.S. Synthesis of tertiary amines containing *gem*-dichlorocyclopropane and cycloacetal fragments. *Russ. J. Appl. Chem.* 2016;89(5):753–757. <https://doi.org/10.1134/S1070427216050116>
- [Original Russian Text: Raskil'dina G.Z., Valiev V.F., Zlotskii S.S. Synthesis of tertiary amines containing *gem*-dichlorocyclopropane and cycloacetal fragments. *Zhurnal Prikladnoi Khimii.* 2016;89(5):619–623 (in Russ.).]
11. Timofeeva S.A., Raskil'dina G.Z., Spirikhin L.V., Zlotskii S.S. Synthesis of amino derivatives of 1,3,5-triazines containing hetero- and carbocyclic moieties. *Russ. J. Appl. Chem.* 2012;85(2):239–243. <https://doi.org/10.1134/S1070427212020139>
- [Original Russian Text: Timofeeva S.A., Raskil'dina G.Z., Spirikhin L.V., Zlotskii S.S. Synthesis of amino derivatives of 1,3,5-triazines containing hetero- and carbocyclic moieties. *Zhurnal Prikladnoi Khimii.* 2012;85(2):250–254 (in Russ.).]
12. Tajti Á., Szatmári E., Perdih F., Keglevich G., *et al.* Microwave-assisted Kabachnik–Fields reaction with amino alcohols as the amine component. *Molecules.* 2019;24(8):1640. <https://doi.org/10.3390/molecules24081640>
13. Tajti Á., Tóth N., Rávai B., Csontos I., *et al.* Study on the microwave-assisted batch and continuous flow synthesis of *N*-alkyl-isoinдолin-1-one-3-phosphonates by a special Kabachnik–Fields condensation. *Molecules.* 2020;25(14):3307. <https://doi.org/10.3390/molecules25143307>
14. Borisova Yu.G., Raskildina G.Z., Zlotsky S.S. Synthesis of *gem*-dichlorocyclopropylmethylmalonates and decarboxylation. *Roumanian J. Chem.* 2016;61(1):29–33.
15. Alieva R.M., Sunagatullina A.Sh., Shakhmaev R.N., Zorin V.V. Synthesis of (E)- and (Z)-isomers of 2-(3-chloroprop-2-en-1-yl)cyclopentanone. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Seriya Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya = ChemChemTech.* 2017;60(4):22–25 (in Russ.). <https://doi.org/10.6060/tcct.2017604.5499>

Об авторах:

Мусин Айрат Ильдарович, аспирант кафедры общей, аналитической и прикладной химии, ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет» (450064, Россия, г. Уфа, ул. Космонавтов, д. 1). E-mail: musin_1995@list.ru. ResearcherID R-9142-2016, SPIN-код РИНЦ 9573-4624, <https://orcid.org/0000-0002-8662-9680>

Султанова Дилара Сабитовна, магистр, ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет» (450064, Россия, г. Уфа, ул. Космонавтов, д. 1). E-mail: sultanova.dilara@yandex.ru. Researcher ID GOG-8112-2022, <https://orcid.org/0000-0002-3994-328X>.

Борисова Юлианна Геннадьевна, к.х.н., преподаватель кафедры общей, аналитической и прикладной химии, ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет» (450064, Россия, г. Уфа, ул. Космонавтов, д. 1). E-mail: yulianna_borisova@mail.ru. Scopus Author ID 56526865000, Researcher ID P-9744-2017, SPIN-код РИНЦ 3777-0375, <https://orcid.org/0000-0001-6452-9454>

Мудрик Татьяна Петровна, к.х.н., заведующий лабораторией ФГБУ «Центр оценки качества зерна» (450097, Россия, г. Уфа, ул. Комсомольская, д. 14). E-mail: t.mudrik@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9930-8002>

Даминев Рустем Рифович, д.т.н., профессор, директор Института нефтегазового инжиниринга и цифровых технологий ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет» (450064, Россия, г. Уфа, ул. Космонавтов, д. 1). E-mail: daminew@mail.ru. Scopus Author ID 15026168000, SPIN-код РИНЦ 3431-0901, <https://orcid.org/0000-0001-8673-5240>

About the authors:

Airat I. Musin, Postgraduate Student, Department of General, Analytical and Applied Chemistry, Ufa State Petroleum Technological University (1, Kosmonavtov ul., Ufa, 450064, Russia). E-mail: musin_1995@list.ru. ResearcherID R-9142-2016, RSCI SPIN-code 9573-4624, <https://orcid.org/0000-0002-8662-9680>

Dilara S. Sultanova, Master, Ufa State Petroleum Technological University (1, Kosmonavtov ul., Ufa, 450064, Russia). E-mail: sultanova.dilara@yandex.ru. Researcher ID GOG-8112-2022, <https://orcid.org/0000-0002-3994-328X>

Yulianna G. Borisova, Cand. Sci. (Chem.), Teacher, Department of General, Analytical and Applied Chemistry, Ufa State Petroleum Technological University (1, Kosmonavtov ul., Ufa, 450064, Russia). E-mail: yulianna_borisova@mail.ru. Scopus Author ID 56526865000, Researcher ID P-9744-2017, RSCI SPIN-code 3777-0375, <https://orcid.org/0000-0001-6452-9454>

Tatyana P. Mudrik, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Laboratory, Center for Grain Quality Assessment (14, Komsomolskaya ul., Ufa, 450097, Russia). E-mail: t.mudrik@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9930-8002>

Rustem R. Daminev, Dr. Sci. (Eng.), Professor, Director, Institute of Oil and Gas Engineering and Digital Technology, Ufa State Petroleum Technological University (1, Kosmonavtov ul., Ufa, 450064, Russia). E-mail: daminew@mail.ru. Scopus Author ID 15026168000, RSCI SPIN-code 3431-0901, <https://orcid.org/0000-0001-8673-5240>

*Поступила: 20.10.2022; получена после доработки: 21.11.2022; принята к опубликованию: 13.01.2023.
The article was submitted: October 20, 2022; approved after reviewing: November 21, 2022; accepted for publication: January 13, 2023.*

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ORGANIC SUBSTANCES

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-29-37>

УДК 66.095.62+544.47+547.326+544.478.1



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

**Совмещенный процесс синтеза
циклогексилциклогексанкарбоксилата из циклогексанола и СО,
катализируемый системой $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{--PPh}_3\text{--}n\text{-толуолсульфокислота}$**

Н.Т. Севостьянова[✉], С.А. Баташев, А.С. Родионова

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, Тула, 300026 Россия

[✉] Автор для переписки, e-mail: sevastyanova.nt@gmail.com

Аннотация

Цели. Изучение возможности совмещения в одном реакторе реакций кислотнокаталитической дегидратации циклогексанола и алкоксикарбонилирования образующегося циклогексена циклогексанолам и оксидом углерода (II). Установление возможности достижения высоких выходов целевого продукта – циклогексилциклогексанкарбоксилата – в мягких условиях при катализе системой $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{--PPh}_3\text{--}n\text{-толуолсульфокислота}$.

Методы. Совмещенный процесс изучался в среде толуола в периодическом стальном реакторе, рассчитанном на работу при повышенном давлении, снабженном стеклянной вставкой, магнитной мешалкой, пробоотборником, устройствами ввода и сброса газов. Реакционная масса с компонентами каталитической системы помещалась в стеклянный реактор внутри стального автоклава. Отбираемые в ходе совмещенного процесса пробы реакционной массы анализировали методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектором.

Результаты. Показана возможность совмещения в одном реакторе дегидратации циклогексанола, катализируемой моногидратом $n\text{-толуолсульфокислоты}$, и алкоксикарбонилирования образующегося циклогексена циклогексанолам и СО при катализе системой $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{--PPh}_3\text{--}n\text{-толуолсульфокислота}$. В мягких условиях (температура 110 °С, давление СО 2.1 МПа) выход целевого продукта достигал 64.8% за 5 ч. Установлено, что совмещенный процесс осложняется образованием побочного продукта – циклогексанкарбоновой кислоты – в результате гидролиза циклогексильного эфира циклогексанкарбоновой кислоты и гидроксикарбонилирования циклогексена.

Выводы. Реакции внутримолекулярной кислотнокаталитической дегидратации циклогексанола и алкоксикарбонилирования образующегося циклогексена, катализируемого системой $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-}n\text{-толуолсульфокислота}$, могут быть совмещены в одном реакторе. $n\text{-Толуолсульфокислота}$ может одновременно выполнять функции катализатора дегидратации циклогексанола и сокатализатора палладий-фосфиновой системы алкоксикарбонилирования циклогексена. Вовлечение циклогексена – продукта обратимой реакции дегидратации циклогексанола – в реакцию алкоксикарбонилирования является фактором смещения равновесия реакции дегидратации в сторону образования циклогексена. Побочным продуктом предлагаемого совмещенного процесса является циклогексанкарбоновая кислота. Вода, образующаяся в результате дегидратации циклогексанола, является фактором снижения выхода целевого продукта, что обусловлено вовлечением последнего в реакцию гидролиза и протеканием реакции гидроксикарбонилирования циклогексена.

Ключевые слова: совмещенный процесс, дегидратация спирта, алкоксикарбонилирование алкена, палладий-фосфиновая система, сильная протонная кислота

Для цитирования: Севостьянова Н.Т., Баташев С.А., Родионова А.С. Совмещенный процесс синтеза циклогексилциклогексанкарбоксилата из циклогексанола и CO, катализируемый системой $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-}n\text{-толуолсульфокислота}$. *Тонкие химические технологии*. 2023;18(1):29–37. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-29-37>

RESEARCH ARTICLE

Combined process of cyclohexyl cyclohexanecarboxylate synthesis from cyclohexanol and CO catalyzed by the $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-}p\text{-toluenesulfonic acid}$ system

Nadezhda T. Sevostyanova✉, Sergey A. Batashev, Anastasia S. Rodionova

Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula, 300026 Russia

✉Corresponding author, e-mail: sevostyanova.nt@gmail.com

Abstract

Objectives. To study the possibility of combining acid-catalytic cyclohexanol dehydration and alkoxy-carbonylation of the formed cyclohexene with cyclohexanol and carbon(II) oxide in a single reactor in order to achieve high yields of the target cyclohexyl cyclohexanecarboxylate product under mild conditions using the $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-}p\text{-toluenesulfonic acid}$ catalytic system.

Methods. The combined process took place in a toluene medium in a periodic steel reactor designed to operate at elevated pressure, equipped with a glass insert, a magnetic stirrer, and a sampler, as well as gas input and discharge devices. The reaction mass with the components of the catalytic system was placed in a glass reactor inside a steel autoclave. The reaction mass samples obtained during the combined process were analyzed by gas-liquid chromatography with a flame ionization detector.

Results. The possibility of combining cyclohexanol dehydration catalyzed by $p\text{-toluenesulfonic acid monohydrate}$ and formed cyclohexene alkoxy-carbonylation with cyclohexanol and CO during catalysis by the $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-}p\text{-toluenesulfonic acid}$ system in a single reactor was demonstrated. Under mild conditions (temperature 110°C; CO pressure 2.1 MPa), the target product yield reached 64.8% in 5 h. However, the combined process is complicated by the formation of a cyclohexanecarboxylic acid by-product formed as a result of the cyclohexyl cyclohexanecarboxylate hydrolysis and the cyclohexene hydroxycarbonylation.

Conclusions. The reactions of intramolecular acid-catalytic cyclohexanol dehydration and formed cyclohexene alkoxy carbonylation catalyzed by the $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-}p\text{-toluenesulfonic acid}$ system can be combined in a single reactor. *p*-Toluenesulfonic acid can simultaneously act as a catalyst for the cyclohexanol dehydration and a co-catalyst of the palladium–phosphine system of cyclohexene alkoxy carbonylation. The involvement of cyclohexene, representing a product of reversible cyclohexanol dehydration, in the alkoxy carbonylation reaction is a factor in shifting the dehydration reaction equilibrium towards the formation of cyclohexene. Cyclohexanecarboxylic acid is a by-product of the proposed combined process. A factor in the reduction of target product yield is water formed as a result of cyclohexanol dehydration due to the involvement of the latter in the hydrolysis reaction and the course of the cyclohexene hydroxycarbonylation.

Keywords: combined process, alcohol dehydration, alkene alkoxy carbonylation, palladium–phosphine system, strong protonic acid

For citation: Sevostyanova N.T., Batashev S.A., Rodionova A.S. Combined process of cyclohexyl cyclohexanecarboxylate synthesis from cyclohexanol and CO catalyzed by the $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-}p\text{-toluenesulfonic acid}$ system. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):29–37 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-29-37>

ВВЕДЕНИЕ

Алкоксикарбонилирование алкенов спиртами и СО – одностадийный способ получения сложных эфиров из доступного сырья, альтернативный традиционно реализуемой этерификации карбоновых кислот спиртами. СО выделяют из синтез-газа, который может быть получен не только из нефти и природного газа, но и каменного угля, а также отходов биомассы – возобновляемого сырьевого источника. В алкоксикарбонилировании алкенов гомогенные палладий-фосфиновые каталитические системы считаются наиболее активными и селективными, поскольку позволяют получать целевые продукты – сложные эфиры – в мягких условиях с высокими выходами [1–9]. Побочными продуктами в этих реакциях являются, как правило, лишь изомерные сложные эфиры. Таким образом, в алкоксикарбонилировании алкенов, катализируемом соединениями палладия, соблюдается принцип экономии атомов, лежащий в основе разработки ресурсосберегающих малоотходных химических технологий с высоким уровнем экологической безопасности.

Однако в ряде случаев алкены являются менее доступными реагентами по сравнению с соответствующими спиртами. Следует отметить, что спирты могут использоваться как субстраты

карбонилирования для получения карбоновых кислот и сложных эфиров, однако в более жестких условиях, чем алкоксикарбонилирование алкенов. Так, в промышленности метоксикарбонилирование этилена – первая стадия в синтезе метилметакрилата по технологии Alpha компании *Lucite* – реализуется при катализе палладий-фосфиновой системой при температуре 80 °С и давлении смеси СО и этилена 1.0 МПа [2, 3]. В то же время карбонилирование метанола в промышленных процессах Monsanto и Cativa, осуществляемых при катализе родиевыми и иридиевыми катализаторами соответственно, требует поддержания температуры 150–200 °С и давления СО 3–6 МПа [10].

Цели данной работы:

1) изучение возможности совмещения в одном реакторе (рис. 1) кислотнокаталитической дегидратации циклогексанола (соединение **1**, реакция (1)) и алкоксикарбонилирования образующегося циклогексена (соединение **2**) циклогексанолом и СО (реакция (2)) при катализе системой $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-}n\text{-толуолсульфокислота (TsOH)}$;

2) установление возможности достижения высоких выходов целевого продукта – циклогексил-циклогексанкарбоксилата (ЦГЦГК, соединение **3**) – в мягких условиях (рис. 1) при катализе указанной каталитической системой.

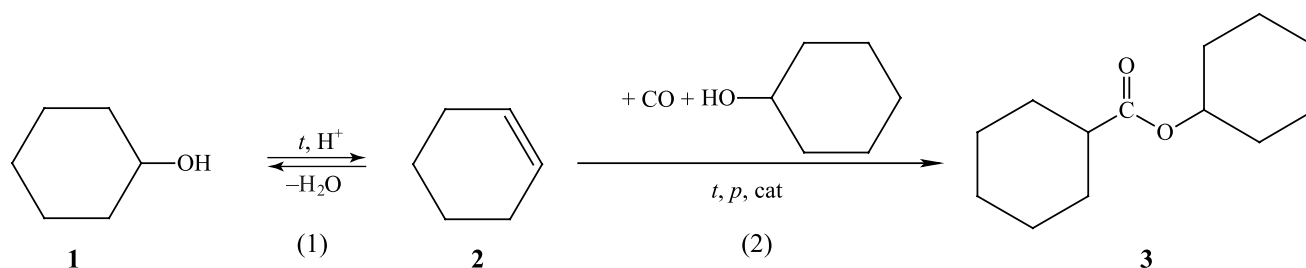


Рис. 1. Схема синтеза циклогексилциклогексанкарбоксилата.

Fig. 1. Scheme for the synthesis of cyclohexyl cyclohexanecarboxylate.

Организация процессов, основанная на совмещении в одном реакторе двух реакций, нацелена на использование дешевого и доступного сырья, не требует выделения и очистки промежуточного продукта и является фактором снижения капитальных и энергзатрат при последующем внедрении. Как следствие, разрабатываемые процессы характеризуются высоким уровнем экономичности, ресурсосбережения и экологической безопасности.

Исследуемый процесс (реакции (1), (2)) является модельным, поскольку алкоксикарбонилирование циклогексена, катализируемое палладий-фосфиновыми системами, не осложняется образованием каких-либо побочных продуктов, в том числе изомерных сложных эфиров. Целевой продукт этого процесса – ЦГЦГК – и другие сложные эфиры циклогексанкарбоновой кислоты могут применяться в качестве добавки к различным видам топлив [11], полупродукта в синтезе лекарственных субстанций [11, 12], пластификаторов [13, 14] и компонентов косметических средств [15].

В качестве каталитических предшественников в алкоксикарбонилировании алкенов наиболее часто используются $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ [4, 16], PdCl_2 [6, 7] и $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ [17]. Ранее с использованием $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ в сочетании с промотирующими добавками PPh_3 и TsOH нами в исследуемом совмещенном процессе был получен продукт 3 с выходом 86.8% за 320 мин при соотношении количеств циклогексанола и TsOH 2.5 : 1.0 (мол.). При дополнении указанной каталитической системы добавкой *n*-тозилата натрия как возможного агента для связывания воды и генерирования *in situ* дополнительных количеств TsOH выход целевого продукта составлял более 99% за то же время при соотношении количества циклогексанола и суммарного количества TsOH и TsONa 1.6 : 1.0 (мол.) [18, 19]. Однако для промышленно важного процесса желательно достижение высоких выходов целевого продукта за более короткое время при минимальном использовании различных добавок, а по возможности, без них. Как было показано

ранее [17], Cl^- -анионы каталитического предшественника негативно влияют на скорость алкоксикарбонилирования. В этой связи на данном этапе исследований возможности реализации совмещенного процесса дегидратации и алкоксикарбонилирования использовался $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ в сочетании с добавками промоторов: PPh_3 – как одного из наиболее активных монофосфинов и TsOH – одной из сильных органических кислот, используемой ранее в алкоксикарбонилировании циклогексена [16–21].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Совмещенный процесс изучался в среде толуола в периодическом стальном реакторе, рассчитанном на работу при повышенном давлении, снабженном магнитной мешалкой, пробоотборником, устройствами ввода и сброса газов. Реакционная масса с компонентами каталитической системы $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 и моногидрат *n*-толуолсульфокислоты – $(\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O})$ помещалась в стеклянный реактор внутри стального автоклава. В ходе опытов температура поддерживалась на уровне 110 °С, давление CO составляло 2.1 МПа, начальные концентрации циклогексанола и компонентов каталитической системы составили: $C_0(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{OH}) = 0.50 \text{ M}$, $C_0(\text{Pd}(\text{OAc})_2) = 2.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_0(\text{PPh}_3) = 2.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_0(\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}) = (0.14\text{--}0.28) \text{ M}$. Подробная методика эксперимента описана в работе [16].

Отбираемые в ходе совмещенного процесса пробы реакционной массы анализировали методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе «Кристаллюкс 4000М» (НПФ Метатех, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и газом-носителем аргон. Скорость потока газа-носителя 1.0 мл/мин, деление потока 1:60. Температура испарителя и детектора составляла 300 °С и 320 °С соответственно. Разделение компонентов реакционной массы проводилось в капиллярной колонке Optima-5 (Macherey-Nagel, Германия) размером 30 м × 0.32 мм с толщиной пленки 0.35 мкм в режиме программирования температуры: в

диапазоне 120–220 °С скорость нагрева 20 град/мин, в диапазоне 220–280 °С скорость нагрева 8 град/мин, изотермический режим 280 °С в течение 2.5 мин. Расчеты площадей пиков осуществлялись с помощью программы NetChrom V 2.1 (НПФ Мета-хром, Россия). Идентификацию пиков на хроматограммах проводили по времени удерживания путем сопоставления с временами удерживания стандартных

образцов веществ. Концентрации веществ 1–3 и циклогексанкарбоновой кислоты (побочный продукт 4) рассчитывали методом внутреннего стандарта, в качестве которого использовали *о*-ксилол. Внутренний стандарт вводили в постоянную концентрацию в раствор циклогексанола в толуоле до начала опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам анализа проб реакционной массы, было установлено, что в качестве промежуточного продукта исследуемого совмещенного процесса образуется циклогексен. Наряду с основным продуктом было зафиксировано образование побочного продукта 4.

Типичные кривые расхода циклогексанола (исходного соединения 1) и накопления циклогексена (промежуточного продукта 2), циклогексанкарбоксилата (целевого продукта 3) и циклогексанкарбоновой кислоты (побочного продукта 4) представлены на рис. 2.

В таблице представлены результаты проведенных опытов при варьировании концентрации TsOH и постоянстве остальных параметров системы. Можно видеть, что увеличение концентрации TsOH с 0.140 до 0.200 М сопровождалось увеличением выхода целевого продукта 3 с 17.2% (0.043 М) до 64.0% (0.160 М). Повышение начальной концентрации TsOH до 0.28 М привело к сокращению времени достижения максимального выхода продукта 3 64.8% до 5 ч. Суммарная концентрация свободного циклогексена и вступившего в реакции карбонилирования с образованием продуктов 3 и 4 увеличивалась с увеличением концентрации TsOH.

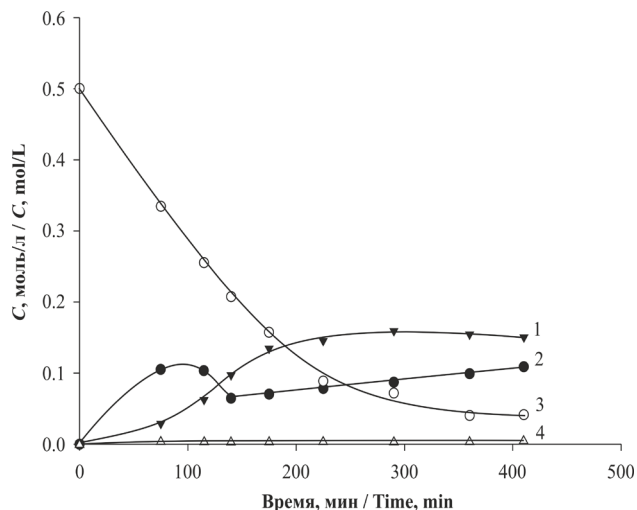


Рис. 2. Кривые расходования реагента и накопления промежуточного, целевого и побочного продуктов в совмещенном модельном процессе при $C(\text{TsOH}) = 0.280 \text{ М}$: 1 – накопление продукта 3; 2 – накопление полупродукта 2; 3 – расходование реагента 1; 4 – накопление продукта 4.

Fig. 2. Curves of reagent consumption and accumulation of intermediate, target and by-products in the combined model process at $C(\text{TsOH}) = 0.280 \text{ М}$: 1 – product 3 accumulation; 2 – intermediate product 2 accumulation; 3 – reagent 1 consumption; 4 – product 4 accumulation.

Таблица. Результаты опытов по варьированию концентрации TsOH как компонента каталитической системы $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-TsOH}$ совмещенного модельного процесса дегидратации циклогексанола и алкоксикарбонилирования образующегося циклогексена

Table. Results of experiments on varying the concentration of TsOH as a component of the $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{-PPh}_3\text{-TsOH}$ catalytic system of the combined model process of the cyclohexanol dehydration and the resulting cyclohexene alkoxy carbonylation

Номер опыта Experiment number	$C(\text{TsOH}), \text{ М}$	Время*, мин Time*, min	$C(1), \text{ М}$	$C(2)^{**}, \text{ М}$	$C(3), \text{ М}$	$C(4), \text{ М}$	$C(2)^{***}, \text{ М}$
1	0.140	450	0.355	0.045	0.043	0.004	0.092
2	0.200	450	0.143	0.034	0.160	0.003	0.197
3	0.250	420	0.112	0.058	0.160	0.004	0.222
4	0.280	290	0.073	0.091	0.162	0.004	0.257

*Время достижения наибольшей концентрации продукта 3. / Time to reach the highest concentration of the product 3.

**Концентрация свободного циклогексена. / Concentration of free cyclohexene.

***Суммарная концентрация свободного циклогексена и вступившего в реакции карбонилирования с образованием продуктов 3 и 4. / Total concentrations of free cyclohexene and cyclohexene entered in carbonylation reactions with the formation of products 3 and 4.

Причинами образования циклогексанкарбоновой кислоты, по-видимому, является наличие в реакционной массе воды, выделяющейся в реакции (1) и вступающей в реакции гидроксикарбонилирования циклогексена (рис. 3, реакция (3)) и гидролиза ЦГЦГК (рис. 4, реакция (4)).

Катализатором реакции (4) может выступать сильная протонная кислота TsOH. Реакции гидроксикарбонилирования и алкоксикарбонилирования могут катализироваться одними и теми же системами, включающими палладиевый предшественник, органофосфин и сильную протонную кислоту [23, 24]. При этом большинство исследователей придерживаются гидридного механизма для обеих реакций [4–9, 16, 17, 20–24].

На основании известных представлений о кислотном катализе дегидратации спиртов и гидридном механизме алкоксикарбонилирования можно ожидать, что дальнейшее повышение $C_0(\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O})$ должно приводить к увеличению скорости совмещенного процесса синтеза ЦГЦГК [16]. Однако дальнейшее увеличение концентрации $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ представляется нецелесообразным, поскольку с точки зрения промышленной реализации процесса высокие концентрации сильных протонных кислот в реакционной массе нежелательны в связи с коррозией стального оборудования. По-видимому, исследования должны продолжаться в направлении поиска оптимальных условий совмещенного процесса, обеспечивающих достижение

высоких выходов ЦГЦГК без увеличения концентрации сильной протонной кислоты. Одним из таких путей является использование органофосфинов – более активных промоторов для палладиевых катализаторов алкоксикарбонилирования по сравнению с монофосфинами [1, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена возможность совмещения в одном реакторе внутримолекулярной кислотнокаталитической дегидратации циклогексанола и алкоксикарбонилирования образующегося циклогексена при катализе системой $\text{Pd}(\text{OAc})_2\text{--PPh}_3\text{--}n\text{-толуолсульфокислота}$. В осуществленном совмещенном процессе $n\text{-толуолсульфокислота}$ одновременно выполняла функции катализатора дегидратации циклогексанола и сокатализатора палладий-фосфиновой системы алкоксикарбонилирования циклогексена. Благодаря вовлечению циклогексена – продукта обратимой реакции дегидратации циклогексанола – в реакцию алкоксикарбонилирования равновесие реакции дегидратации было смещено в сторону образования циклогексена, и общая конверсия циклогексанола достигала 85%. Дальнейшие исследования совмещенного процесса должны проводиться в направлении поиска оптимальных условий, обеспечивающих достижение высоких выходов ЦГЦГК без увеличения концентрации сильной протонной кислоты.

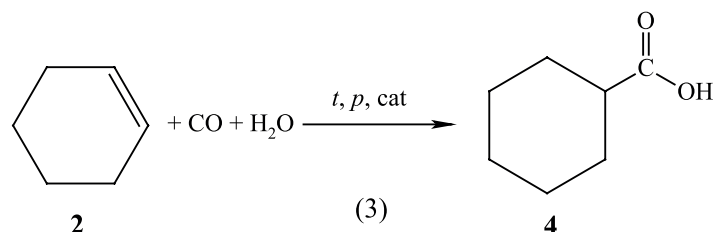


Рис. 3. Схема гидроксикарбонилирования циклогексена.
Fig. 3. Scheme for hydroxycarbonylation of cyclohexene.

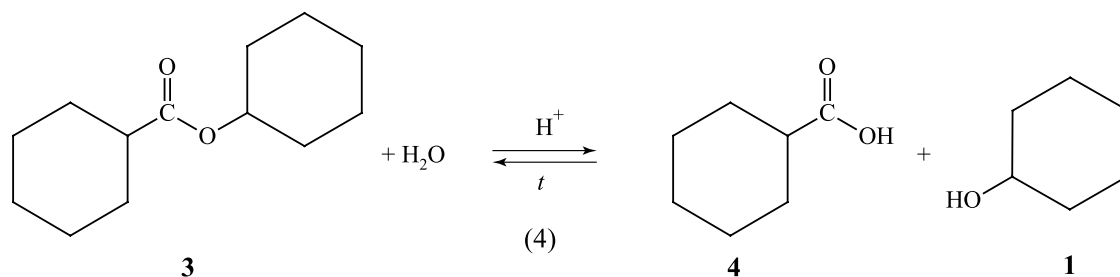


Рис. 4. Схема гидролиза циклогексилциклогексанкарбоксилата.
Fig. 4. Scheme for the hydrolysis of cyclohexyl cyclohexanecarboxylate.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 22-23-00102), <https://rscf.ru/project/22-23-00102/>.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-23-00102, <https://rscf.ru/project/22-23-00102/>.

Вклад авторов

Н.Т. Севостьянова – концепция работы, идея организации совмещенного процесса, анализ и интерпретация полученных данных, написание текста статьи.

С.А. Баташев – хроматографический анализ реакционной массы, анализ и интерпретация полученных данных, участие в написании текста статьи.

А.С. Родионова – экспериментальные исследования совмещенного процесса с отбором проб реакционной массы, расчеты по результатам опытов, участие в написании текста статьи.

Authors' contributions

N.T. Sevostyanova – concept of the study, the idea of organizing the combined process, the analysis and interpretation of the data obtained, and writing of the text of the article.

S.A. Batashev – chromatographic analysis of the reaction mass, analysis and interpretation of the data obtained, and participation in writing the text of the article.

A.S. Rodionova – experimental studies of the combined process with sampling the reaction mass, calculation on the results of experiments, and participation in writing the text of the article.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Biermann U., Bornscheuer U., Feussner I., Meier M.A.R., Metzger J.O. Fatty Acids and their Derivatives as Renewable Platform Molecules for the Chemical Industry. *Ang. Chem. Int. Ed.* 2021;60(37):20144–20165. <https://doi.org/10.1002/anie.202100778>

2. Tullo A.H. A unique methyl methacrylate plant in Singapore owes its success to a handful of British chemists. *Chemical & Engineering News*. 2009;87(42). URL: <https://cen.acs.org/articles/87/i42/New.html> (Accessed November 30, 2022).

3. Nomura K., Awang N.W.B. Synthesis of bio-based aliphatic polyesters from plant oils by efficient molecular catalysis: a selected survey from recent reports. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2021;9(16):5486–5505. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00493>

4. Liu Y., Mecking S. A synthetic polyester from plant oil feedstock by functionalizing polymerization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019;58(11):3346–3350. <https://doi.org/10.1002/anie.201810914>

5. Herrmann N., Köhnke K., Seidensticker T. Selective product crystallization for concurrent product separation and catalyst recycling in the isomerizing methoxycarbonylation of methyl oleate. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2020;8(29):10633–10638. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03432>

6. Nifant'ev I.E., Sevostyanova N.T., Batashev S.A., Vinogradov A.A., Vinogradov A.A., Churakov A.V., Ivchenko P.V. Synthesis of methyl β -alkylcarboxylates by Pd/diphosphine-catalyzed methoxycarbonylation of methylenealkanes $RCH_2CH_2C(R)=CH_2$. *Appl. Catal. A: Gen.* 2019;581:123–132. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2019.05.030>

7. Nifant'ev I., Bagrov V., Vinogradov A., Vinogradov A., Ilyin S., Sevostyanova N., Batashev S., Ivchenko P. Methylenealkane-based low-viscosity ester oils: synthesis and outlook. *Lubricants*. 2020;8(5):50–59. <https://doi.org/10.3390/lubricants8050050>

8. Liang W.-Y., Liu L., Zhou Q., Yang D., Lu Y., Liu Y. Pd-catalyzed alkoxy carbonylation of alkenes promoted by H_2O free of auxiliary acid additive. *Mol. Catal.* 2020;482:110221. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.10.016>

9. Akiri S.O., Ojwach S.O. Methoxycarbonylation of olefins catalysed by homogeneous palladium(II) complexes of (phenoxy)imine ligands bearing alkoxy silane groups. *Inorganica Chim. Acta*. 2019;489:236–243. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.02.025>

10. Kalck P., Le C., Serp B.P. Recent advances in the methanol carbonylation reaction into acetic acid. *Coord. Chem. Rev.* 2020;402:213078. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.213078>

11. Лapidус А.Л., Пирожков С.Д. Каталитический синтез органических соединений карбонилированием непредельных углеводов и спиртов. *Успехи химии*. 1989;58(2):197–233. URL: <https://www.uspkhim.ru/RCR3430pdf>

Lapidus A.L., Pirozhkov S.D. Catalytic synthesis of organic compounds by the carbonylation of unsaturated hydrocarbons and alcohols. *Russ. Chem. Rev.* 1989;58(2):117–138. <https://doi.org/10.1070/RC1989v058n02ABEH003430>

[Original Russian Text: Lapidus A.L., Pirozhkov S.D. Catalytic synthesis of organic compounds by the carbonylation of unsaturated hydrocarbons and alcohols. *Uspekhi Khimii*. 1989;58(2):197–233 (in Russ.). URL: <https://www.uspkhim.ru/RCR3430pdf>]

12. Hoffmann U., Jansen M., Reents R., Stahr H. *Process for cyclohexanecarboxylic acid derivatives*: US Pat. 20090253927 A1. Publ. 08.10.2009.
13. Colle K., Stanat J.E., Reinoso J.J., Godwin A.D. *C₇-C₁₂ Secondary alcohol esters of cyclohexanoic acid*: WO Pat. 2009/070398 A1. Publ. 04.06.2009.
14. Godwin A.D. *Co-plasticizer systems*: WO Pat. 2009/085453 A2. Publ. 09.07.2009.
15. Jenni K., Springer O. *Cosmetic and dermatological formulations including phenoxyalkyl esters*: US Pat. 20100068160 A1. Publ. 18.03.2010.
16. Nifant'ev I.E., Sevostyanova N.T., Averyanov V.A., Batashev S.A., Vorobiev A.A., Toloraya S.A., Bagrov V.V., Tavtorkin A.N. The concentration effects of reactants and components in the Pd(OAc)₂ / *p*-toluenesulfonic acid / trans-2,3-bis(diphenyl-phosphinomethyl)-norbornane catalytic system on the rate of cyclohexene hydrocarbomethoxylation. *Appl. Catal. A: Gen.* 2012;449:145–152. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2012.09.020>
17. Аверьянов В.А., Севостьянова Н.Т., Баташев С.А., Несолена С.В. Механизм каталитического действия системы Pd(PPh₃)₂Cl₂-PPh₃-*n*-толуолсульфокислота на гидрокарбалкокислирование циклогексена в среде циклогексанола. *Нефтехимия*. 2006;46(6):435–445. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9466418>
- Aver'yanov V.A., Sevost'yanova N.T., Batashev S.A., Nesolenaya S.V. Mechanism of the catalytic effect of the Pd(PPh₃)₂Cl₂-PPh₃-*p*-toluenesulfonic acid system on cyclohexene hydrocarbalkoxylation in cyclohexanol. *Pet. Chem.* 2006;46(6):405–414. <https://doi.org/10.1134/S0965544106060053>
- [Original Russian Text: Aver'yanov V.A., Sevost'yanova N.T., Batashev S.A., Nesolenaya S.V. Mechanism of the catalytic effect of the Pd(PPh₃)₂Cl₂-PPh₃-*p*-toluenesulfonic acid system on cyclohexene hydrocarbalkoxylation in cyclohexanol. *Нефтехимия*. 2006;46(6):435–445 (in Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9466418>]
18. Sevostyanova N.T., Batashev S.A. One-pot cyclohexyl cyclohexanecarboxylate synthesis from cyclohexanol and CO at catalysis by Pd(PPh₃)₂Cl₂ / PPh₃ / *p*-toluenesulfonic acid system. *Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers 2019: Proceedings of the International Conference*. 2019. P. 239. URL: <http://irbiscorp.spsl.nsc.ru/fulltext/WORKS/2019/Abstracts.pdf>
19. Севостьянова Н.Т., Баташев С.А., Родионова А.С., Козленко Д.К. Совмещенный процесс синтеза циклогексилциклогексанкарбоксилата из циклогексанола и CO. *Современная химическая физика: Сборник тезисов XXXIV симпозиума*. 2022. P. 170. URL: http://www.chemicalphysics.ru/?page_id=1360
- [Sevostyanova N.T., Batashev S.A., Rodionova A.S., Kozlenko D.K. Combined process of cyclohexyl cyclohexanecarboxylate synthesis from cyclohexanol and CO. In: *Sovremennaya Khimicheskaya Fizika: Sbornik Tezisev 34 Simpoziuma (Modern Chemical Physics: Collection of Abstracts of the 34th Symposium)*. 2022. P. 170 (in Russ.). URL: http://www.chemicalphysics.ru/?page_id=1360]
20. Vavasori A., Cavinato G., Toniolo L. Effect of a hydride source (water, hydrogen, *p*-toluenesulfonic acid) on the hydroesterification of ethylene to methyl propionate using a Pd(PPh₃)₂(TsO)₂ (TsO = *p*-toluenesulfonate anion) catalyst precursor. *J. Mol. Catal. A: Chemical*. 2001;176(1–2):11–18. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(01\)00235-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(01)00235-7)
21. Vavasori A., Toniolo L., Cavinato G. Hydroesterification of cyclohexene using the complex Pd(PPh₃)₂(TsO)₂ as catalyst precursor: Effect of a hydrogen source (TsOH, H₂O) on the TOF and a kinetic study (TsOH: *p*-toluenesulfonic acid). *J. Mol. Catal. A: Chemical*. 2003;191(1):9–21. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(02\)00358-8](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(02)00358-8)
22. Li J., Ren W., Dai J., Shi Y. Palladium-catalyzed regio- and enantioselective hydroesterification of aryl olefins with CO gas. *Org. Chem. Front.* 2018;5(1):75–79. <https://doi.org/10.1039/C7QO00622E>
23. Brennfürer A., Neumann H., Beller M. Palladium-catalyzed carbonylation reactions of alkenes and alkynes. *ChemCatChem*. 2009;1(1):28–41. <https://doi.org/10.1002/cctc.200900062>
24. Neumann H., Brennfürer A., Beller M. An efficient and practical sequential one-pot synthesis of suprofen, ketoprofen and other 2-arylpropionic acids. *Adv. Synth. Catal.* 2008;350(14–15):2437–2442. <https://doi.org/10.1002/adsc.200800415>

Об авторах:

Севостьянова Надежда Тенгизовна, к.х.н., доцент, старший научный сотрудник, руководитель научно-производственного центра «Химреактивдиагностика», ФГБОУ ВО «Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого» (300026, Россия, г. Тула, пр-т Ленина, д. 125). E-mail: sevostyanova.nt@gmail.com. Scopus Author ID 25643582900, ResearcherID M-8567-2014, SPIN-код РИНЦ 9239-7136, <https://orcid.org/0000-0002-3499-2226>

Баташев Сергей Александрович, к.х.н., доцент, старший научный сотрудник научно-производственного центра «Химреактивдиагностика», ФГБОУ ВО «Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого» (300026, Россия, г. Тула, пр-т Ленина, д. 125). E-mail: tulapharma@gmail.com. SPIN-код РИНЦ 8241-9789, Scopus Author ID 14071256200, ResearcherID N-1405-2018, <https://orcid.org/0000-0001-7537-7740>

Родионова Анастасия Сергеевна, исполнитель по гражданско-правовому договору реализации гранта Российского научного фонда, ФГБОУ ВО «Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого» (300026, Россия, г. Тула, пр-т Ленина, д. 125). E-mail: rodionova.nastia@ya.ru. Scopus Author ID 57189375048, <https://orcid.org/0000-0002-0896-5208>

About the authors:

Nadezhda T. Sevostyanova, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Senior Researcher, Head, Research and Production Center "Himreaktivdiagnostika," Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University (125, Lenina pr., Tula, 300026, Russia). E-mail: sevostyanova.nt@gmail.com. RSCI SPIN-code 9239-7136, Scopus Author ID 25643582900, ResearcherID M-8567-2014, <https://orcid.org/0000-0002-3499-2226>

Sergey A. Batashev, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Senior Researcher, Research and Production Center "Himreaktivdiagnostika," Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University (125, Lenina pr., Tula, 300026, Russia). E-mail: tulapharma@gmail.com. RSCI SPIN-code 8241-9789, Scopus Author ID 14071256200, ResearcherID N-1405-2018, <https://orcid.org/0000-0001-7537-7740>

Anastasia S. Rodionova, Researcher, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University (125, Lenina pr., Tula, 300026, Russia). E-mail: rodionova.nastia@ya.ru. Scopus Author ID 57189375048, <https://orcid.org/0000-0002-0896-5208>

*Поступила: 12.10.2022; получена после доработки: 30.11.2022; принята к опубликованию: 24.01.2023.
The article was submitted: October 12, 2022; approved after reviewing: November 30, 2022; accepted for publication: January 24, 2023.*

**ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

**CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF MEDICINAL COMPOUNDS
AND BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-38-47>



УДК 615.28

RESEARCH ARTICLE

Screening of medicinal plant extracts in Vietnam and investigation of their combination for preventing and treating gout

Anh C. Ha^{1,2,✉}, Tan M. Le^{1,2}

¹Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT),
268 Ly Thuong Kiet Street, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University Ho Chi Minh City (VNU-HCM), Linh Trung Ward, Thu Duc District,
Ho Chi Minh City, Vietnam

✉Corresponding author, e-mail: hcanh@hcmut.edu.vn

Abstract

Objectives. The study aimed to examine the potential use of ethanol extracts of four medicinal plants to prevent and treat gout disease.

Methods. An investigation of some typical compound contents such as polyphenols, flavonoids, and tannins in terms of two bioactive abilities, including anti-xanthine oxidase and antioxidant was carried out in *Eclipta prostrata* L., *Artemisia vulgaris* L., *Apium graveolens* L., and *Piper betle* L. samples. Subsequently, the weight ratios of *Piper betle* L. and *Artemisia vulgaris* L. were investigated to reduce the total tannin content and get the most suitable anti-xanthine oxidase activity.

Results. As well as having the highest target compound contents, *Piper betle* L. demonstrated the best anti-xanthine oxidase and antioxidant abilities even while its IC_{50} values were lower than positive control; however, its high total tannin content can cause some side effects. A mixture with a weight ratio of 1:1 of *Piper betle* L. and *Artemisia vulgaris* L. had a total tannin content half that of *Piper betle* L. as well as demonstrating potential anti-xanthine oxidase and antioxidant activities when IC_{50} was about 3.94 and 20.85 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Conclusions. Out of the four selected plants, *Piper betle* L. demonstrated the best potential material for preventing and treating gout disease. However, due to the high tannin content in it, a mix of *Piper betle* L. and *Artemisia vulgaris* L. at a weight ratio of 1:1 gave optimal results for application in treatment.

Keywords: gout disease, xanthine oxidase inhibitors, tannins, *Piper betle* L.

For citation: Ha A.C., Le T.M. Screening of medicinal plant extracts in Vietnam and investigation of their combination for preventing and treating gout. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):38–47. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-38-47>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Скрининг экстрактов лекарственных растений во Вьетнаме и исследование их комбинации для профилактики и лечения подагры

А.К. Ха^{1,2,✉}, Т.М. Ле^{1,2}

¹Химико-технологический факультет, Технологический университет Хошимина, 268 Ли Тхыонг Кьет ул., г. Хошимин, Вьетнам

²Вьетнамский национальный университет Хошимина, Линь Чунг Уорд, Район Тхёк, г. Хошимин, Вьетнам

✉ Автор для переписки, e-mail: hcanh@hcmut.edu.vn

Аннотация

Цели. Изучить потенциальное использование этанольных экстрактов четырех лекарственных растений для профилактики и лечения подагры.

Методы. Образцы эклипты простёртой (*Eclipta prostrata* L.), полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.), сельдерея пахучего (*Apium graveolens* L.) и перца бетель (*Piper betle* L.) исследовались с точки зрения содержания в них полифенолов, флавоноидов и дубильных веществ, а также наличия биологически активных свойств, включая антиксантин-оксидазную и антиоксидантную активность. Далее были найдены весовые соотношения *Piper betle* L. и *Artemisia vulgaris* L., позволяющие снизить общее содержание танина и получить наиболее подходящую антиксантин-оксидазную активность.

Результаты. Помимо самого высокого содержания целевого соединения, *Piper betle* L. продемонстрировал наилучшие антиксантин-оксидазные и антиоксидантные свойства, даже несмотря на то, что его значения IC_{50} были ниже положительного контроля. Однако высокое содержание общего танина в нем может вызывать некоторые побочные эффекты. Смесь *Piper betle* L. и *Artemisia vulgaris* L. с массовым соотношением 1:1 имела общее содержание танина вдвое меньше, чем *Piper betle* L., а также демонстрировала

потенциальную антиксантиноксидазную и антиоксидантную активность, при этом IC_{50} составлял около 3.94 и 20.85 мкг/мл соответственно.

Выводы. Из четырех отобранных растений *Piper betle* L. является наилучшим потенциальным материалом для профилактики и лечения подагры. Однако из-за высокого содержания в нем танина смесь *Piper betle* L. и *Artemisia vulgaris* L. в соотношении по массе 1:1 дала оптимальные результаты для применения в лечении.

Ключевые слова: болезнь подагра, ингибиторы ксантиноксидазы, дубильные вещества, *Piper betle* L.

Для цитирования: На А.С., Ле Т.М. Screening of medicinal plant extracts in Vietnam and investigation of their combination for preventing and treating gout. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):38–47. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-38-47>

INTRODUCTION

A significant global increase in the number of gout patients has recorded been in recent years. While the highest proportions of gout patients are experienced among the populations of North America and Europe, the increase has also been dramatic in in Asia [1]. Gout is a chronic syndrome caused by the deposition of urate crystals [2] and related to xanthine oxidase enzyme activities due to this enzyme playing a catalyst role in the reaction to uric acid from purine [3]. Thus, xanthine oxidase inhibition, representing one of the main therapies for avoiding increased concentrations of uric acid in human blood, can be used to reduce the risk of gout [4]. Although allopurinol is one of the most popular drugs for inhibiting xanthine oxidase enzyme activity, it is often associated with side effects [5, 6]. Therefore, the identification new potential substances for preventing and treating gout becomes an urgent task. In this connection, the investigation of plants containing chemical constituents having various biological activities has attracted a lot of interest from scientists [7]. Over 12000 valuable plant species in Vietnam have been identified, with over a third of them demonstrating biological and pharmacological activities [8]. Although anti-xanthine oxidase abilities have been reported [9, 10],

many medicinal plants already used in alternative therapies have yet to be studied in terms of their phytochemical and biological activities. Therefore, in this study, four selected plants, including *Eclipta prostrata* L., *Artemisia vulgaris* L., *Apium graveolens* L., *Piper betle* L. were evaluated in terms of their anti-xanthine and antioxidant activities, as well as their polyphenol-, flavonoid-, and tannin content. The two plants identified as showing the best potential were additionally investigated in terms of their combined efficacy.

MATERIALS AND METHODS

Materials and chemicals

Leaves of *Eclipta prostrata* L., *Artemisia vulgaris* L., *Apium graveolens* L., *Piper betle* L. were collected in Hoocon district, Hochiminh city, Vietnam, in February 2022 during the dry season, which is the most appropriate time for harvesting these plants. The plant samples, including leaves and trunk, are shown in Fig. 1. After washing with water and drying in shade until the moisture content was under 12%, the samples were stored in a sealed bag for further use. The plants were authenticated by the Department of Ecology and Evolutionary Biology,

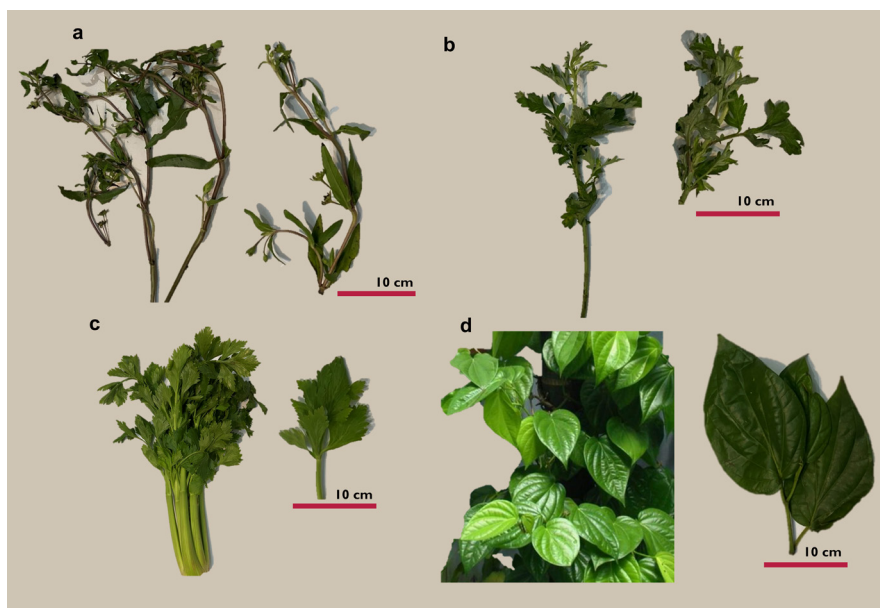


Fig. 1. Photographs of plants and leaves of (a) *Eclipta prostrata* L. (b) *Artemisia vulgaris* L. (c) *Apium graveolens* L. (d) *Piper betle* L. The photographs were captured and edited by authors.

Faculty of Biology and Biotechnology, Ho Chi Minh City University of Science, Vietnam National University.

Absolute ethanol (C_2H_5OH), methanol (CH_3OH), sodium nitrite ($NaNO_2$), sodium carbonate (Na_2CO_3), sodium hydroxide ($NaOH$), aluminum chloride ($AlCl_3$), dimethyl sulfoxide (DMSO), iron(III) chloride ($FeCl_3$), diclofenac sodium and other reagents of analytical grade were obtained from Merck (Darmstadt, FR, Germany). Folin-Ciocalteu's reagent, quercetin, xanthine oxidase, xanthine, ascorbic acid, allopurinol, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and gallic acid were provided by Sigma-Aldrich (Singapore).

Preparation of plant extract

The ethanolic extracts from each plant were extracted with absolute ethanol having a solid-to-liquid ratio of 1:10 g/mL at 45 °C for 45 min. Next, the extracts were filtered with vacuum filtration and evaporated until complete removal of excess solvent. The residue was then recovered for further extraction. The yield of extraction is determined by Eq.1:

$$\text{Extraction yield} = \frac{m_{\text{extract}}}{m_{\text{sample}}} \times 100\%, \quad (1)$$

where m_{extract} is the weight of dry extract (g) and m_{sample} is the weight of dry raw material (g).

Qualitative phytochemical screening

The presence of bioactive compounds: polyphenols, flavonoids, tannins, alkaloids, saponins, and carotenoids were determined with phytochemical screening [11–13].

Determination of total polyphenol content (TPC)

The TPC of the extracts was determined using the Folin–Ciocalteu reagent following the method of Sánchez-Rangel *et al.* [14]. Briefly, a mixture consisting of 200 μ L of Folin–Ciocalteu reagent and 40 μ L of the diluted extract was stored at 25 °C for 5 min prior to adding 600 μ L of Na_2CO_3 20 w/v % and 3160 μ L of distilled water. The absorbance of the mixture was determined using a UV–Vis spectrophotometer Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific, USA) at 760 nm. TPC was expressed as milligram of gallic acid equivalent per gram of sample (mg GAE/g). The test sample without Folin–Ciocalteu reagent was considered as a control.

Determination of total flavonoid content (TFC)

The concentration of flavonoids in the extracts was determined using the aluminum chloride colorimetric assay method [15]. Initially, a mixture comprising 2 mL of distilled water, 0.15 mL of $NaNO_2$ 5%, and 0.5 mL of the extract dissolved

in methanol, was prepared and incubated for 5 min. Afterward, 0.15 mL of 10% AlCl_3 , 1 mL of NaOH 1M, and 1.2 mL of distilled water were respectively added to the mixture. The absorbance of the mixture was measured at 425 nm using Genesys 10S UV–Vis spectrophotometer. The number of total flavonoids was shown as milligrams of quercetin equivalents per gram of sample (mg QUE/g). The test sample without AlCl_3 was considered blank.

Determination of total tannin content (TTC)

The concentration of tannins in the extracts was determined by the Folin–Ciocalteu method as described Maklar *et al.* [16]. A total of 2 mL of extract in methanol was mixed with 8 mL distilled water and 10 mL sodium acetate buffer (pH 5) to obtain solution 1. A mixture of 500 μL of solution 1 and 250 μL Folin–Ciocalteu reagent was sonicated in 5 min, and then 4250 μL Na_2CO_3 33% was added. The mixture was sonicated for 30 min before determining absorbance (A_1) at 720 nm. A total of 10 mL solution 1 reacts with 50 mg casein at 30 °C for 1 h. The mixture was filtered to recover solution 2. Then, a mixture of 500 μL of solution 2 and 250 μL Folin–Ciocalteu reagent was sonicated in 5 min. Then, 4250 μL Na_2CO_3 33% was added before sonicating in 30 min. The absorbance of solution 2 (A_2) was also measured at 720 nm. The test sample without Folin–Ciocalteu reagent was defined as a control. The tannin absorbance in the extract is calculated as Eq. 2:

$$A = (A_1 - B_1) - (A_2 - B_2), \quad (2)$$

where A , A_1 , and A_2 are the absorbance of tannin for solution 1 and solution 2; B_1 and B_2 are the absorbance of the blank in solution 1 and solution 2, respectively.

The TTC is expressed as milligrams of tannic acid equivalents per gram of sample (mg TAE/g).

In vitro xanthine oxidase inhibitory activity assay

The Abd El-Rahman and Abd-ELHak method was applied to evaluate the xanthine oxidase inhibitory activity of studied extracts [17]. Firstly, the reaction mixture contains 250 μL extract in DMSO 5%, 175 μL of sodium phosphate buffer (pH 7.5), and 150 μL enzyme (0.2 units/mL of xanthine oxidase in phosphate buffer). The mixture was incubated for 15 min at 37 °C before adding 300 μL of

xanthine (mM) and then further incubating for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped with the addition of 125 μL HCl 1M. The absorbance was measured at 290 nm by Genesys 10S UV–Vis spectrophotometer. Allopurinol was used as a positive control. Xanthine oxidase inhibitory activity was expressed as the percentage inhibition of xanthine oxidase and calculated as Eq. 3:

$$\% \text{ XO inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100\%, \quad (3)$$

where XO is xanthine oxidase; A_{blank} is the absorbance at 290 nm of blank; A_{sample} is the absorbance at 290 nm of the sample.

In vitro antioxidant assay

The presence of free radicals is one of the consequences of diseases [18]. The DPPH radical is the most popular method to determine free radical scavenging activity, Sharma and Bhat method with slight modification was used in this study [19]. Briefly, 120 μL of extract in methanol at various concentrations were reacted with 180 μL of DPPH in methanol. The reaction mixture was stored in the dark at 25 °C for 30 min. The DPPH solution, ascorbic acid (vitamin C), and methanol were used as negative-, positive-, and blank controls, respectively. The absorbance was measured at 517 nm using a Genesys 10S UV–Vis spectrophotometer to calculate the percentage of inhibition (Eq. 4) as follows:

$$\begin{aligned} \% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \\ = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100\%, \end{aligned} \quad (4)$$

where A_{control} is the absorbance of the negative control and A_{sample} is the absorbance of the test solution.

Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate; the data were expressed as mean $\pm$ standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction efficiency of medical plant extracts

In the present study, the first task was to investigate the number of extraction cycles. All four

materials were extracted four times; the results are shown in Fig. 2. There were significant differences among the researched materials and the cycles. The total extraction efficiency of *Apium graveolens* L. leaves was the highest at 21.18%. However, the total extraction efficiencies of the others were not much different, falling in the range of 11.87 to 13.26%. The main reasons for the variation were the significant amounts of petiole in the *Eclipta prostrata* L. and *Artemisia vulgaris* L. samples and high level of fiber in the *Piper betle* L. leaves. Meanwhile, the first-cycle extractions were the highest for all plants, with values falling in the range of 5.63 to 12.35%. In the first cycle, there were significant differences between compound concentrations in the internal and external plants. As a result, the diffusion was much easier than the others. The figure for *Apium graveolens* L., the first extraction yield, made up about 58% total one, whereas, in terms of *Piper betle* L., it accounted for roundly 72% total yield. The cycle extraction efficiency additionally decreased as the number of extracts increased, with fourth cycle extraction yields at less than 1%. Therefore, three-cycle extraction was applied in the following steps.

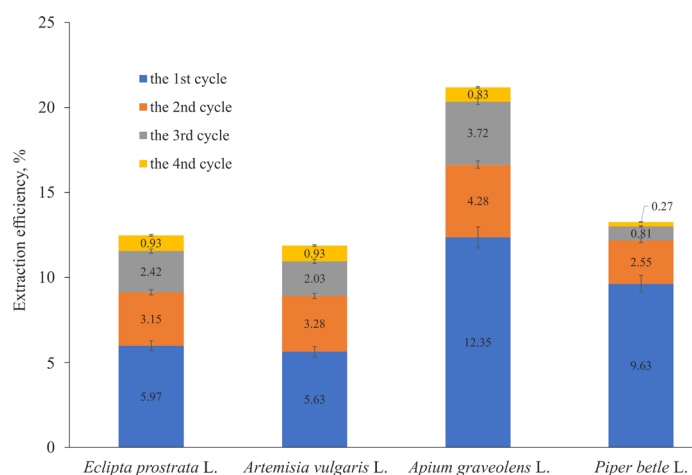


Fig. 2. Extraction efficiencies of four studied plants.

Phytochemical screening of medicinal plant extracts

Phytochemical screening was conducted to identify some bioactive compounds in the materials. The results can help to predict some bioactive abilities or side effects. In this study, typical natural compounds, including polyphenols, flavonoids, tannins, alkaloids, saponins, and carotenoids were determined; the results are shown in Table 1. Polyphenols demonstrate various bioactivity

abilities, such as anti-xanthine oxidase, antioxidant, anti-carcinogenic, anti-oxygenase, and anti-telomerase [20, 21]. Flavonoids demonstrate significant bioactivity, especially anti-xanthine oxidase, antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial [21, 22]. Tannins are strongly antioxidant compounds due to the presence of many hydroxyls ($-OH$) in their structures, although they can be characterized by difficult absorption and associated digestion problems [23, 24]. Moreover, bioactive capabilities offered by alkaloids, such as anti-xanthine oxidase and anti-inflammatory effects, address gout symptoms [25, 26]. Saponins are known to play important roles in preventing or treating cancer, reducing inflammation, and increasing blood cholesterol [27, 28]. Finally, carotenoids are demonstrated as typical antioxidant compounds because of their reactions to superoxide radicals and peroxy groups [29].

The experiment results (Table 1) demonstrated the presence of polyphenols, flavonoids, tannins, and saponins in all four extracts. As a result, it is predicted that these materials will exhibit anti-xanthine oxidase and antioxidant activities. In addition, the antioxidant effect of carotenoids found in *Artemisia vulgaris* L. and *Piper betle* L. offers additional mechanisms to those of other antioxidant compounds such as polyphenols, flavonoids, tannins, and carotenoids. Antioxidant activity contributes to the balance of homeostasis when suffering from diseases [18].

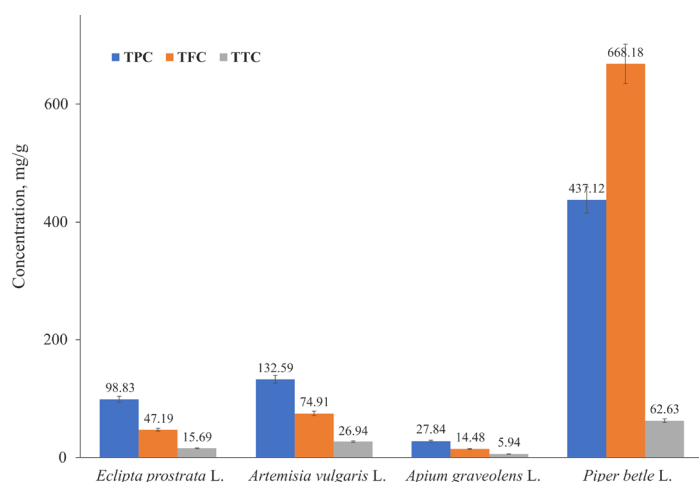
TPC, TFC, and TTC of extract plants

As already mentioned, polyphenols, flavonoids, and tannins are considered in terms of their important xanthine oxidase inhibition and antioxidant roles. In this study, the TPC and TTC were measured using Folin–Ciocalteu reagent, while TFC was determined by the aluminum chloride method; these popular methods offer reliable results [15, 16]. The TPC, TFC, and TTC were determined as described in Fig. 3. The research materials demonstrated widely ranging differences in terms of these values. *Piper betle* L. had by far the highest values when the TPC, TFC, and TTC were 437.12 mgGA/g; 668.18 mgQEU/g, and 62.63 mgTAE/g, respectively. In contrast, the values of *Apium graveolens* L. were the lowest. It is forecasted that *Piper betle* L. shows the highest potential xanthine oxidase inhibition and antioxidant activity, whereas these bioactive abilities of *Apium graveolens* L. can be much worse. However, the high value of TTC of *Piper betle* L. can cause some side effects, especially in terms of difficult absorption and digestion of nutrients [24]. For this reason, it is necessary to use it cautiously.

Table 1. Phytochemical screening results from leaf extract of four plants

Bioactive compounds	Test/Reagent	Medicinal plants			
		<i>Eclipta prostrata</i> L.	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	<i>Apium graveolens</i> L.	<i>Piper betle</i> L.
Polyphenols	Iron(III) chloride	+	+	+	++
Flavonoids	Lead acetate 10%	+	+	+	++
Tannins	Gelatin 1%	+	++	+	++
Alkaloids	Bouchardat	+	++	–	+
Saponins	Liebermann–Burchard	+	+	+	+
Carotenoids	Sulfuric acid	–	+	–	++

– Not detected, + Slightly positive reaction, and ++ Strong positive reaction.

**Fig. 3.** Total content of polyphenols, flavonoids, and tannins of four extract plants.

Anti-xanthine oxidase and antioxidant activities

To confirm their bioactive abilities, *in vitro* assay of the the materials was carried out with anti-xanthine oxidase and antioxidant as illustrated in Table 2.

The bioactive properties as illustrated by IC_{50} values are shown in Table 2. As expected, *Piper betle* L. showed the most potential material, with IC_{50} values of anti-xanthine oxidase and antioxidant abilities

being lower than the positive controls, such as allopurinol and ascorbic acid. The results agree with an earlier study carried out into the xanthine oxidase inhibitory effect of *Piper betle* L. [30]. Regarding anti-xanthine oxidase, the data of *Eclipta prostrata* L. and *Artemisia vulgaris* L. were almost the same, at 164 and 161.65 $\mu\text{g/mL}$, respectively. However, regarding antioxidant ability, *Artemisia vulgaris* L. was about 9 times better than *Eclipta prostrata* L. due to the difference in TTC values. In contrast, *Apium graveolens* L. had the worst anti-xanthine oxidase (IC_{50} 554.83 $\mu\text{g/mL}$) and antioxidant abilities (IC_{50} 309.52 $\mu\text{g/mL}$) due to the lowest TPC, TFC and TTC values.

Combination of *Piper betle* L. and *Artemisia vulgaris* L.

Out of four plants, *Piper betle* L. was demonstrated to be the most promising material for preventing and treating gout disease and its complications, primarily in terms of reducing free radicals. However, as already mentioned, its high TTC value can lead to some negative side effects. Moreover, the TTC value of *Artemisia vulgaris* L. was significantly lower than that of *Piper betle* L., which demonstrated potential bioactive properties. Therefore, in this

Table 2. Anti-xanthine oxidase and antioxidant of four studied extract plants

Materials	IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	
	Anti-xanthine oxidase	Antioxidant
<i>Eclipta prostrata</i> L.	164.00 + 2.51	56.80 + 2.75
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	161.65 + 0.53	6.65 + 0.30
<i>Apium graveolens</i> L.	554.83 + 0.79	309.52 + 1.22
<i>Piper betle</i> L.	1.18 + 0.02	4.10 + 0.08
Positive control	1.57 + 0.01 *	5.87 + 0.12 **

* Allopurinol.

** Ascorbic acid.

study, the leaf powders of *Piper betle* L. and *Artemisia vulgaris* were mixed together in different ratios to lower the TTC and improve anti-xanthine oxidase ability. The effects of the mass ratio of *Piper betle* L. and *Artemisia vulgaris* on TTC and xanthine oxidase activity are shown on Fig. 4.

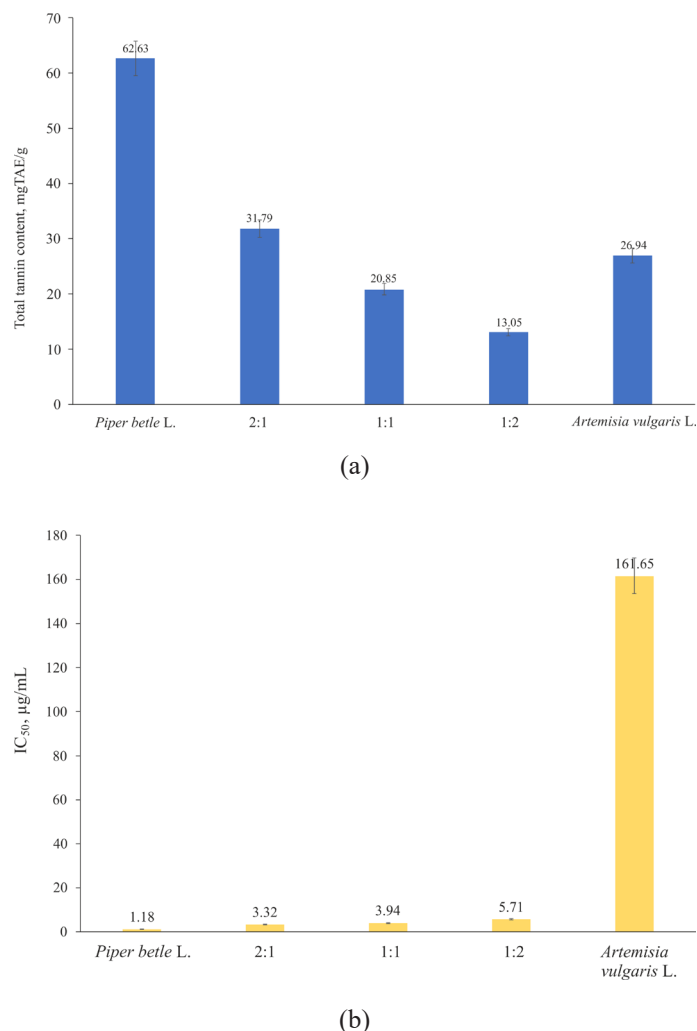


Fig. 4. TTC values (a) and xanthine oxidase inhibition (b) of different ratios of *Piper betle* L. and *Artemisia vulgaris* L. (w/w).

The findings showed a decline in the TTC data with an increase in the ratio of *Artemisia vulgaris* L. Here, the TTC value ratio 2:1 (w/w) was half that of *Piper betle* L. Meanwhile, the TTC data of the ratio 1:1 (w/w) was about three times lower than that of *Piper betle* L. In contrast, when increasing the content of *Piper betle* L., the combination shows better xanthine oxidase inhibition; all of these combinations showed dramatically better results than *Artemisia vulgaris* L. Both ratios 2:1 and 1:1 (w/w) had approximately similar IC₅₀ values about 3.5 times higher than that of *Piper betle* L. Meanwhile, this

value of 1:2 (w/w) was approximately 5 times higher than in the *Piper betle* L. data.

The decreasing TTC in the mixed extraction could be due to the low tannin content of *Artemisia vulgaris* L. Further, ethanol has more selectivity for polyphenol and flavonoid compounds; thus, with the high TFC and TPC in both plants, the tannin content in combination samples was lower than in the single samples. Accordingly, the ratio 1:1 (w/w) was the most promising when considering the aims of decreased TTC and the most effective xanthine oxidase inhibition.

CONCLUSIONS

The present work investigated four plants in terms of their concentrations of three main compound groups comprising polyphenols, flavonoids, and tannins, as well as in terms of their anti-xanthine oxidase and antioxidant activities. Although the leaves of *Piper betle* L. showed the most promising results, its TTC value was significant at 62.63 mgTAE/g. In order to reduce side effects, a combination of *Piper betle* L. and *Artemisia vulgaris* L. was prepared and investigated. As a result, the ratio 1:1 (w/w) showed the most potential when the TTC and IC₅₀ were 20.85 mgTAE/g and 3.94 µg/mL.

Благодарности

Мы выражаем признательность за время и средства, предоставленные Технологическим университетом Хошима (HCMUT) и Вьетнамским национальным университетом Хошима (VNU-HCM) для этого исследования.

Acknowledgments

We acknowledge the support of time and facilities from Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT), VNU-HCM, for this study.

Вклад авторов

А.К. Ха – написание и редактирование текста, общее руководство, разработка концепции и методологии.

Т.М. Ле – разработка концепции, формальный анализ, проведение исследований, написание текста статьи.

Authors' contributions

Anh C. Ha – writing the text of the review and editing, supervision, methodology, and conceptualization.

Tan M. Le – conceptualization, formal analysis, investigation, and writing the text of the article.

Авторы заявляют, что у них нет известных конкурирующих финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, описанную в этом документе.

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this document.

REFERENCES

1. Collaborators G.O.D., Bernabe E., Marcenés W., Hernandez C.R., *et al.* Global, regional, and national levels and trends in burden of oral conditions from 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease 2017 study. *J. Dent. Res.* 2020;99(4):362–373. <https://doi.org/10.1177/0022034520908533>
2. Emmerson B.T. The management of gout. *N. Engl. J. Med.* 1996;334(7):445–451. <https://doi.org/10.1056/nejm199602153340707>
3. Kostić D.A., Dimitrijević D.S., Stojanović G.S., Palić I.R., Đorđević A.S., Ickovski L.D. Xanthine oxidase: isolation, assays of activity, and inhibition. *J. Chem.* 2015;2015(2):Article ID 294858. <https://doi.org/10.1155/2015/294858>
4. Theoduloz C., Franco L., Ferro E., Rarschmann G.S. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. *J. Ethnopharmacology.* 1988;24(2–3):179–183. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90149-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90149-3)
5. Rødevand E., Sletvold O., Kvande K.T. Side effects off allopurinol. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 2004;124(20):2618–2619.
6. Pacher P., Nivorozhkin A., Szabó C.J.P. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacolog. Reviews.* 2006;58(1):87–114. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.6>
7. Salmerón-Manzano E., Garrido-Cardenas J.A., Manzano-Agugliaro F. Worldwide research trends on medicinal plants. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020;17(2):3376. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
8. Duong-Trung N., Quach L.-D., Nguyen C.-N. J. Learning deep transferability for several agricultural classification problems. *Int. J. Adv. Comput. Sci. Appl.* 2019;10(1). <http://doi.org/10.14569/IJACSA.2019.0100107>
9. Duong N.T., Vinh P.D., Thuong P.T., *et al.* Xanthine oxidase inhibitors from *Archidendron clypearia* (Jack.) I.C. Nielsen: Results from systematic screening of Vietnamese medicinal plants. *Asian Pacific J. Trop. Med.* 2017;10(6):549–556. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.06.002>
10. Nguyen M.T.T., Awale S., Tezuka Y., *et al.* Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biolog. Pharm. Bull.* 2004;27(9):1414–1421. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1414>
11. Doss A. Preliminary phytochemical screening of some Indian medicinal plants. *Anc. Sci. Life.* 2009;29(2):12–16.
12. Kumar A., Ilavarasan R., Jayachandran T., *et al.* Phytochemicals investigation on a tropical plant, *Syzygium cumini* from Kattuppalayam, Erode district, Tamil Nadu, South India. *Pakistan J. Nutrition.* 2009;8(1):83–85.
13. Audu S.A., Mohammed I., Kaita H.A. Phytochemical screening of the leaves of *Lophira lanceolata* (Ochanaceae). *Life Sci. J.* 2007;4(4):75–79. <https://doi.org/10.7537/marslsj040407.17>
14. Sánchez-Rangel J.C., Benavides J., Heredia J.B., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velázquez D.A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods.* 2013;5(21):5990–5999. <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>
15. Baba S.A., Malik S.A. J.J. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *J. Taibah University Sci.* 2015;9(4):449–454. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.001>
16. Makkar H.P. Measurement of total phenolics and tannins using Folin–Ciocalteu method. In: *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Dordrecht: Springer; 2003. P. 49–51. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7_3
17. Abd El-Rahman H.S.M., Abd-ELHak N.A.M. Xanthine oxidase inhibitory activity and antigout of celery leek parsley and molokhia. *Adv. Biochem.* 2015;3(4):40–50. <https://doi.org/10.11648/j.ab.20150304.11>
18. Moskovitz J., Yim M.B., Chock P.B. Free radicals and disease. *Archives Biochem. Biophys.* 2002;397(2):354–359. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2692>
19. Sharma O.P., Bhat T.K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 2009;113(4):1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
20. Abbas M., Saeed F., Anjum F.M., *et al.* Natural polyphenols: An overview. *Int. J. Food Properties.* 2017;20(8):1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
21. Liu L., Zhang L., Ren L., Xie Y. Advances in structures required of polyphenols for xanthine oxidase inhibition. *Food Front.* 2020;1(2):152–167. <https://doi.org/10.1002/fft2.27>
22. Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Sci. Word J.* 2013;2013:ArticleID162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
23. Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., *et al.* Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008;8(5):436–447. <https://doi.org/10.2174/138955708784223486>
24. Butler L.G. Effects of condensed tannin on animal nutrition. In: Hemingway R.W., Karghesy J.J., Branham S.J. (Eds.). *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. Boston: Springer; 1989. P. 391–402. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7511-1_24
25. Fachriyah E., Ghifari M., Anam K. Isolation, Identification, and Xanthine oxidase inhibition activity of alkaloid compound from *Peperomia pellucida*. In: *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2018;349(1):012017. <http://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/349/1/012017>
26. Barbosa-Filho J.M., *et al.* Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2006;16(1):109–139. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100020>
27. Kim J.H., Hahm D.H., Yang D.C., Kim J.H., Lee H.J., Shim I. Effect of crude saponin of Korean Red Ginseng on high fat diet-induced obesity in the rat. *J. Pharmacolog. Sci.* 2005;97(1):124–131. <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0040184>
28. Wina E., Muetzel S., Becker K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production A Review. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53(21):8093–8105. <https://doi.org/10.1021/jf048053d>
29. Stahl W., Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molec. Aspect. Med.* 2003;24(6):345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
30. Ha A.C., Nguyen C. D., Le T.M. Screening medicinal plant extracts for xanthine oxidase inhibitory activity. *Fine Chem. Technol.* 2022;17(2):131–139. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-131-139>

Об авторах:

Ань К. Ха, PhD, к.ф.н., Химико-технологический факультет, Технологический университет Хошимина (268 Ли Тхыонг Кьет ул., Район 10, г. Хошимин, Вьетнам); Вьетнамский национальный университет Хошимина (Линь Чунг Уорд, Район Тхёк, г. Хошимин, Вьетнам). E-mail: hcanh@hcmut.edu.vn. Scopus Author ID 56485522100, <https://orcid.org/0000-0001-7919-4028>

Тан М. Ле, аспирант, Химико-технологический факультет, Технологический университет Хошимина (268 Ли Тхыонг Кьет ул., Район 10, г. Хошимин, Вьетнам); Вьетнамский национальный университет Хошимина (Линь Чунг Уорд, Район Тхёк, г. Хошимин, Вьетнам). Email: minhthan.le997@gmail.com. Scopus Author ID 57220162555, ResearcherID GWC-6849-2022, <https://orcid.org/0000-0002-7956-1067>

About the Authors:

Anh C. Ha, PhD, Doctor of Medicinal Chemistry, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology (268 Ly Thuong Kiet Street, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam); Vietnam National University Ho Chi Minh City (Linh Trung Ward, Thu Duc District, Ho Chi Minh City, Vietnam). E-mail: hcanh@hcmut.edu.vn. Scopus Author ID 56485522100, <https://orcid.org/0000-0001-7919-4028>

Tan M. Le, Postgraduate Student, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology (268 Ly Thuong Kiet Street, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam); Vietnam National University Ho Chi Minh City (Linh Trung Ward, Thu Duc District, Ho Chi Minh City, Vietnam). E-mail: minhthan.le997@gmail.com. Scopus Author ID 57220162555, ResearcherID GWC-6849-2022, <https://orcid.org/0000-0002-7956-1067>

Поступила: 26.09.2022; получена после доработки: 07.02.2022; принята к опубликованию: 20.02.2023.

The article was submitted: September 26, 2022; approved after reviewing: February 07, 2023; accepted for publication: February 20, 2023.

The text was submitted by the authors in English

Edited for English language and spelling by Thomas A. Beavitt

БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>



УДК 615.37

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

**Способ получения рекомбинантных антител,
продуцируемых клеточной линией, трансдуцированной
рекомбинантными аденовирусами**

**Е.С. Седова[✉], Д.Н. Щербинин, А.С. Банделюк, Л.В. Верховская, Н.Ю. Вискова,
Е.Д. Авдони́на, В.В. Прокофьев, Е.И. Рябова, И.Б. Есмагамбетов, К.А. Первойкина,
Е.А. Богачева, А.А. Лысенко, М.М. Шмаров**

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

[✉]Автор для переписки, e-mail: sedova-es@yandex.ru

Аннотация

Цели. Разработать технологию получения рекомбинантных антител в суспензионной культуре клеток человека НЕК293 с помощью трансдукции рекомбинантными аденовирусами человека пятого серотипа, несущими гены, экспрессирующие тяжелые и легкие цепи антител, на примере двух противогриппозных антител широкого спектра действия 27F3 и CR9114.

Методы. Рекомбинантные аденовирусы Ad5-27F3-H, Ad5-CR9114-H и Ad5-27F3-L, несущие ген тяжелой цепи антитела 27F3, ген тяжелой цепи антитела CR9114 и ген легкой цепи 27F3, были получены с помощью набора AdEasy™ Adenoviral vector system. Для накопления препаративных количеств рекомбинантных антител r27F3 и rCR9114 суспензионную клеточную линию НЕК293 трансдуцировали рекомбинантными аденовирусами, несущими гены тяжелых и легких цепей антител, и культивировали клетки в биореакторе волнового типа. Рекомбинантные антитела очищали из культуральной жидкости хроматографическим методом. Молекулярную массу полученных антител

анализировали с помощью белкового электрофореза, их способность взаимодействовать с вирусами гриппа А и В методом вестерн-блот анализа, а способность нейтрализовать вирусы гриппа А и В с помощью реакции вирус-нейтрализации.

Результаты. Отработана методика накопления и очистки рекомбинантных антител r27F3 и CR9114 из культуральной жидкости суспензионной культуры клеток человека после трансдукции ее рекомбинантными аденовирусами, несущими гены тяжелых и легких цепей этих антител. Показана способность антитела r27F3 взаимодействовать с вирусами гриппа А подгруппы 1 (кроме вируса гриппа А субтипа H2) и подгруппы 2 и нейтрализовать их. Показана способность антитела rCR9114 взаимодействовать с вирусами гриппа А подгруппы 1 и вирусами гриппа В, а также нейтрализовать вирусы гриппа А подгруппы 1.

Выводы. Отработана технология получения рекомбинантных антител в суспензионной культуре клеток HEK293 с помощью трансдукции рекомбинантными аденовирусами, несущими гены, экспрессирующие тяжелые и легкие цепи антител, и показана их специфичность.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа, суспензионная культура клеток

Для цитирования: Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Банделюк А.С., Верховская Л.В., Вискова Н.Ю., Авдонина Е.Д., Прокофьев В.В., Рябова Е.И., Есмагамбетов И.Б., Первойкина К.А., Богачева Е.А., Лысенко А.А., Шмаров М.М. Способ получения рекомбинантных антител, продуцируемых клеточной линией, трансдуцированной рекомбинантными аденовирусами. *Тонкие химические технологии*. 2023;18(1):48–64. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>

RESEARCH ARTICLE

Method for obtaining recombinant antibodies produced by a cell line transduced with recombinant adenoviruses

Elena S. Sedova✉, Dmitriy N. Shcherbinin, Alina S. Bandelyuk, Ludmila V. Verkhovskaya, Natalia Yu. Viskova, Elena D. Avdonina, Vladimir V. Prokofiev, Ekaterina I. Ryabova, Ilias B. Esmagambetov, Kristina A. Pervoykina, Elena A. Bogacheva, Andrei A. Lysenko, Maksim M. Shmarov

The Gamaleya National Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

✉Corresponding author, e-mail: sedova-es@yandex.ru

Abstract

Objectives. To develop a technology for obtaining recombinant antibodies in a suspension culture of human HEK293 cells using transduction with recombinant adenovirus serotype 5 (rAd5) carrying genes expressing heavy and light chains of antibodies on the example of two broad-spectrum anti-influenza antibodies 27F3 and CR9114.

Methods. Ad5-27F3-H, Ad5-CR9114-H, and Ad5-27F3-L recombinant adenoviruses carrying the 27F3 antibody heavy chain gene, CR9114 antibody heavy chain gene, and 27F3 light chain gene, respectively, were generated using the AdEasy™ Adenoviral vector system. To accumulate preparative amounts of recombinant r27F3 and rCR9114 antibodies, the HEK293 suspension cell line was transduced with recombinant adenoviruses carrying genes for heavy and light chains of antibodies. The cells were cultured in a wave-type bioreactor. Chromatography was used to purify recombinant antibodies from the culture medium. After analyzing the molecular weights of purified antibodies using protein electrophoresis, their ability to interact with influenza A and B viruses was analyzed using the Western blot technique, while their ability to neutralize influenza A and B viruses was evaluated using the virus neutralization assay.

Results. A method for the accumulation and purification of recombinant r27F3 and CR9114 antibodies from the culture medium of a suspension culture of human cells following transduction with its recombinant adenoviruses carrying the genes for heavy and light chains of these antibodies was developed. The ability of the r27F3 antibody to interact with and neutralize influenza A viruses of group 1 (except influenza A virus subtype H2) and group 2 was shown. The ability of the rCR9114 antibody to interact with influenza A viruses of group 1 and influenza B viruses, as well as to neutralize influenza A viruses of group 1, was demonstrated.

Conclusions. A technology for obtaining recombinant antibodies in a suspension culture of HEK293 cells using transduction with recombinant adenoviruses carrying genes expressing heavy and light chains of antibodies was developed along with a confirmation of their specificity.

Keywords: recombinant antibodies, recombinant human adenovirus 5 serotype, suspension cell culture

For citation: Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Bandelyuk A.S., Verkhovskaya L.V., Viskova N.Yu., Avdonina E.D., Prokofiev V.V., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Pervoykina K.A., Bogacheva E.A., Lysenko A.A., Shmarov M.M. Method for obtaining recombinant antibodies produced by a cell line transduced with recombinant adenoviruses. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):48–64 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря таким свойствам, как высокое сродство и специфичность к конкретному антигену, моноклональные антитела широко используются как в лабораторной практике для обнаружения, очистки и характеристики целевых белков, так и в медицине, для диагностических и терапевтических целей [1, 2]. Биологические препараты на основе антител являются одним из самых продаваемых классов биомолекул на современном рынке.

Современные рекомбинантные технологии позволяют проводить наработку антител в препаративных количествах. На сегодняшний день для продукции рекомбинантных антител (pAT), а также их фрагментов, применяют следующие системы экспрессии: бактериальную, дрожжевую, экспрессию с помощью бакуловирусных векторов в клетках насекомых, а также экспрессию в клетках млекопитающих [3]. Все эти системы экспрессии подразумевают получение высоко-

производительного продуцента, постоянно экспрессирующего целевой белок. Бактериальная [4] и дрожжевая [5] системы экспрессии характеризуются высоким выходом целевого продукта (20–1000 мг антитела с 1 л культуральной жидкости), однако подходят только для получения негликозилированных фрагментов антител (бактерии) или высоко манозилированных форм антител, которые быстро выводятся из организма (дрожжи) [6]. Гликозилирование антител, полученных в дрожжевой и бакуловирусной системе экспрессии [7], отличается от нативного гликозилирования антител млекопитающих [8]. Сегодня большинство терапевтических антител производят в клетках млекопитающих, которые лучше всего подходят для продукции pAT, обладающих наибольшей степенью биологического сходства с антителами, вырабатываемыми в организме человека. Количество pAT, получаемых в клетках СНО (клетки яичника китайского хомячка) могут достигать примерно 10 г/л культуральной

жидкости [8]. Еще более высокого титра антител можно добиться при экспрессии в эмбриональной линии клеток сетчатки человека Per.C6 (*Crucell*, Лейден, Нидерланды) – до 27 г/л в перфузионном биореакторе. Однако создание высокопродуктивных клеточных линий слишком дорого, трудоемко и требует много времени [9].

Более простым и дешевым методом является временная экспрессия генов антител в клетках млекопитающих, так как она не требует создания клеточных линий-продуцентов [10]. Такой способ продукции антител подходит для мелкосерийного и внутрилабораторного производства. В качестве примера можно привести самый распространенный на сегодняшний день метод наработки рАТ – временная котрансфекция клеточной линии СНО двумя плазмидами, несущими экспрессионные кассеты с легкой и тяжелой цепями антитела. При использовании такой технологии экспрессионная кассета не интегрируется в геном клетки и, соответственно, длительная экспрессия антител не поддерживается, гены экспрессируются в течение нескольких дней, после чего транскрипт теряется из-за деления клетки или факторов окружающей среды [11].

Несмотря на широкое применение, временная экспрессия рАТ в клетках СНО также имеет недостатки. Показано, что профиль гликозилирования различается у белков, получаемых в культуре клеток СНО, и белков, получаемых в культурах клеток человека [12]. Поэтому такие человеческие клеточные линии, как Per.C6 и HEK293, также широко используются для получения моноклональных антител. Клеточная линия HEK293 способна обеспечивать оптимальные пост-трансляционные модификации антител человека, включая их гликановый профиль [13, 14]. Системы экспрессии, основанные на суспензионных клетках человека, с использованием бессывороточных сред, поддерживающих высокую плотность суспензии, позволяют добиться выхода целевых антител в десятки и сотни миллиграмм с литра культуральной среды [6]. Однако трансфекция суспензионных клеточных культур является трудоемким методом, требующим использования достаточно дорогих реактивов, а также высокоочищенных плазмид [15], что не оправдано для мелкосерийного и внутрилабораторного производства.

В связи с вышесказанным, в настоящее время актуальными является разработка новых или усовершенствование существующих технологий для наработки и очистки рАТ. Одной из таких технологий является использование рекомбинантных вирусных векторов, позволяющих эффективно доставлять генетическую информацию во многие типы клеток, в том числе в суспензионные

культуры клеток человека [16]. Использование рекомбинантных вирусных векторов для доставки в клетки-продуценты генетической информации, кодирующей целевые антитела, позволяет удешевить и упростить технологию благодаря исключению стадии трансфекции. Наиболее распространенным и хорошо изученным вирусным вектором для доставки генетической информации в клетки человека, является рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа (pAd5). Нами была разработана методика получения рАТ путем трансдукции линии клеток эмбриональной почки человека HEK293 pAd5, несущими гены тяжелой и легкой цепи целевых антител. Такой подход впервые используется для разработки технологии получения препаративных количеств рекомбинантных антител. В качестве целевых антител были выбраны антитела к гемагглюнину вируса гриппа широкого спектра действий – 27F3 [17] и CR9114 [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы

В работе использовали вирусы гриппа A/A/California/04/2009 (H1N1) (номера в GenBank KY238116–KY238123), A/BlackDuck/NewJersey/1580/1978 (H2N3) (номера в GenBank KX879562–KX879569), A/Aichi/2/1968 (H3N2) (номера в GenBank KX879570–KX879577), A/Duck/Pennsylvania/10218/1984 (H5N2) (номера в GenBank KX879578–KX879585), A/Chicken/Moscow/NJ294598-12/20017 (H7N2) (номера в GenBank MN400380–MN400388), A/Swine/HongKong/9A-1/1998 (H9N2) (номера в GenBank KX879586–KX879593), а также вирусы гриппа B – B/Phuket/3073/2013 и B/Washington/20/2019, полученные из Государственной коллекции вирусов РФ (подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Культуры клеток

Адгезионная и суспензионная клеточные культуры эмбриональной почки человека HEK293 были получены из Коллекции клеточных культур лаборатории культур тканей подразделения Института вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Культура клеток аденокарциномы кишечника Сасо-2 была получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук.

Антитела

В работе был использован антивидовой иммунопероксидазный конъюгат Anti-Human IgG (Fc specific)–Peroxidase antibody (A0170, Merck, Германия).

Получение рAd5, экспрессирующих гены тяжелой и легкой цепи антитела человека 27F3, а также ген тяжелой цепи антитела человека CR9114

Последовательности нуклеотидов, кодирующие тяжелые и легкие цепи целевых антител, были химически синтезированы (*Евроген*, Россия) и клонированы в плазмиду рAL-TA. Далее целевые гены переклонировали в плазмиду рShuttle-CMV из набора AdEasy™ Adenoviral vector system (*Agilent Stratagene*, США). Рекомбинантные аденовирусы Ad5-27F3-Н, Ad5-CR9114-Н и Ad5-27F3-L, несущие гены тяжелой цепи антитела 27F3, ген тяжелой цепи антитела CR9114 и ген легкой цепи антитела 27F3, соответственно, получали согласно инструкции к набору. Титры рAd5 определяли на адгезионной культуре клеток НЕК293 с помощью реакции бляшкообразования [19].

Накопление препаративных количеств рАТ г27F3 и гCR9114 в культуральной жидкости

Для накопления препаративных количеств антител г27F3 и гCR9114 суспензионную клеточную линию НЕК293 трансдуцировали рAd5 Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-Н или Ad5-27F3-L и Ad5-CR9114-Н. Для этого клетки культивировали в биореакторе волнового типа в мешках для культивирования клеток Biostat® Cultibag RM 5L (*Sartorius AG*, Германия) в культуральной среде CDM4НЕК293 HyClone™ (*Cytiva*, США) с добавлением 2 г/л бикарбоната натрия (*ПанЭко*, Россия), 1 г/л Poloxamer 188 (*Corning*, США) и 4 мМ L-глутамин (*ПанЭко*, Россия) при температуре 37 °С и 5% CO₂. После достижения концентрации 2·10⁶ клеток/мл в культуру асептически вносили 100 мл вирусной суспензии, содержащей аденовирус Ad5-27F3-L (2·10⁸ БОЕ/мл) (бляшкообразующих единиц в мл), и 200 мл суспензии, содержащей аденовирус Ad5-27F3-Н (10⁸ БОЕ/мл), или 200 мл суспензии, содержащей аденовирус Ad5-CR9114-Н (10⁸ БОЕ/мл). Клетки совместно с рекомбинантными аденовирусами инкубировали в течение 3 суток до достижения 50–60% цитопатического действия (ЦПД). Процент погибших клеток определяли путем визуального подсчета в камере Горяева аликвоты клеточной суспензии,

окрашенной трипановым синим. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 7700g в течение 20 мин при комнатной температуре (20 °С) и отбирали надосадочную жидкость, которую хранили при температуре –70 °С в стерильных пробирках.

Препаративное выделение рАТ г27F3 и гCR9114 из культуральной жидкости

Четыре литра осветленной культуральной жидкости фильтровали через капсульный фильтр Sartopore® 2 0.45/0.2 мкм (*Sartorius AG*, Германия). рН культуральной жидкости доводили до 7.2 добавлением 1 М Трис-НСl, рН 8. Кондуктивность доводили до 17 мС раствором 5 М хлорида натрия. Хроматографическую колонку ХК26/20 (*Cytiva*, США), упакованную 20 мл сорбента MabSelect SuRe™ (*Cytiva*, США), уравнивали буфером, содержащим 20 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, рН 7.2. Культуральную жидкость наносили с линейной скоростью 500 см/ч. После нанесения колонку промывали 10 объемами колонки буфером, содержащим 20 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, рН 7.2. Антитела элюировали в изократическом режиме буфером, содержащим 150 мМ хлорида натрия, 0.1% Tween® 20, 200 мМ глицин-НСl, рН 3.5, и нейтрализовали добавлением в элюат 10% раствора 1 М Трис-НСl, рН 8. Дополнительную очистку и замену буфера на буфер, содержащий 20 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 0.05% Tween® 20, рН 7.2, проводили при помощи гель-фильтрации на хроматографической колонке ХК 26/100 (*Cytiva*, США), упакованной сорбентом Superdex™ 200 prep grade (*Cytiva*, США).

Для удаления остаточного количества возможной примеси рAd5 проводили противовирусную фильтрацию препаратов рАТ при помощи фильтров Viresolve® Pro Micro (*Millipore*, США). Фильтрацию осуществляли при постоянном давлении 0.9 бар, при помощи подачи сжатого воздуха. Отработанные фильтры перед утилизацией стерилизовали автоклавированием.

Дот-иммуноферментный анализ (дот-ИФА)

На нитроцеллюлозный фильтр по радиусу располагали точки для последующего нанесения образцов и визуального контроля адсорбции, включая точки для положительного и отрицательного контролей. Образцы в объеме 1.5 мкл наносили на точку и давали им высохнуть, контролируя на просвет. Затем нитроцеллюлозный фильтр отмывали 3 раза для удаления несвязавшихся белков раствором 0.1% Tween® 20.

От неспецифического связывания фильтр блокировали 30 мин на шейкере рабочим фосфатным буфером pH 7.2 с 2% инертным белком Blosker™ Casein в фосфатно-солевом буфере (*Thermo Fisher Scientific*, США). По окончании инкубации фильтр отмывали три раза дистиллированной водой, затем три раза по 10 мин раствором 0.1% Tween® 20 на шейкере. После отмывки фильтр инкубировали в рабочем разведении 1/5000 антивидового иммунопероксидазного конъюгата Anti-Human IgG (Fc specific)–Peroxidase antibody (*Merck*, Германия) в течение 30–40 мин при 37 °C на шейкере. После окончания инкубации снова проводили отмывку. Окрашивание проводили готовым раствором 3,3'-диаминобензидина Pierce™ DAB Substrate Kit (*Thermo Fisher Scientific*, США). Реакцию останавливали через 10 мин, перенеся фильтр в дистиллированную воду.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН)

Фракционирование белков проводили методом электрофореза в 10% ПААГ-ДСН, в буферной системе Лэммли, с использованием вертикального прибора для мини-гелей Mini-Protean® 3 Cell (*Bio-Rad*, США). С целью анализа мономерной и мультимерной форм белка, перед внесением в гель образцы были обработаны в денатурирующих (+) и неденатурирующих (–) условиях. К образцу (+) был добавлен равный объем двукратного диссоциирующего буфера 2× Laemmli Sample Buffer (*Merck*, Германия), содержащего меркаптоэтанол, затем пробы были прогреты при 95 °C в течение 7 мин. К образцу (–) был добавлен равный объем двукратного буфера, не содержащего меркаптоэтанол, без последующего прогревания. Образцы вносили в лунки геля и проводили электрофорез при постоянной силе тока 20 мА/гель в электродном буфере следующего состава: 25 мМ Трис-HCl, 0.2 М глицина, 0.1% додецилсульфат натрия, pH 8.3. По окончании электрофореза гель сканировали с помощью прибора Gel Doc™ EZ imager (*Bio-Rad*, США). В качестве маркеров для электрофореза были использованы PageRuler™ Unstained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США) и PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография и гель-фильтрация (ВЭЖХ-ГФ)

Для изучения очищенных препаратов рАТ r27F3 и rCR9114 применяли метод ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1260 Infinity II (*Agilent Technologies*, США)

и хроматографическую колонку Phenomenex SEC-s3000 (размер частиц: 5 мкм, размер пор: 290 Å, геометрия: 300 × 7.8 мм) (*Phenomenex*, США). Хроматографию проводили в изократическом режиме, со скоростью потока 0.3 мл/мин, 25 °C, с использованием ультрафиолетового детектора на длине волны 280 нм. Обсчет полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения OpenLAB CDS Chemstation VL Edition (*Agilent Technologies*, США).

Изучение функциональной активности рАТ с помощью вестерн-блоттинга

Для постановки вестерн-блоттинга был осуществлен электрофорез в ПААГ-ДСН, а затем проведен трансфер белков из геля на мембрану полусухим переносом на приборе Trans Blot® SD Semi-dry Transfer cell (*Bio-Rad*, США) при постоянной силе тока 250 мА на площадь геля 5 × 8 см. По окончании переноса нитроцеллюлозную мембрану Nitrocellulose membranes 0.2 (*Bio-Rad*, США) трижды отмывали в дистиллированной воде в течение 10 мин и блокировали свободные сайты мембраны буфером, содержащем инертный белок Blosker™ Casein в фосфатно-солевом буфере (*Thermo Fisher Scientific*, США) в течение 30 мин при 37 °C на шейкере. Затем мембрану инкубировали буферном растворе, содержащем антитело r27F3 или антитело CR9114 в рабочем разведении 1/50 на шейкере при 22 °C в течение ночи (16 ч). По окончании инкубации, мембрану промывали дистиллированной водой, затем трижды по 10 мин фосфатным буфером pH 7.2 с 0.1% Tween® 20 на шейкере. Затем проводили инкубацию с вторичными антителами к Fc-фрагменту IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1/5000 в течение часа при 37 °C на шейкере. После инкубации мембрану снова отмывали и проводили хемилюминисцентную детекцию связавшегося комплекса с использованием реактива ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (*GE Healthcare*, США) с последующим сканированием иммунореплики на приборе Amersham™ Imager 680 (*GE Healthcare*, США).

Накопление и концентрирование вирусов гриппа

Вирусы гриппа А и В были накоплены в аллантоисной жидкости 9-дневных куриных эмбрионов при 37 °C в течение 48 ч. Вирус-содержащая аллантоисная жидкость хранилась при –70 °C.

Вирусосодержащую аллантоисную жидкость после осветления центрифугированием при

3000 об/мин, 15 мин, 4 °C наслаивали на 4 мл 20% сахарозы в буферном растворе, содержащем 0.15 М NaCl и 0.01 М Трис-HCl, pH 7.2 и осаждали ультрацентрифугированием в роторе SW-27 (*Beckman Coulter*, США) со скоростью 22000 об/мин в течение 90 мин при 4 °C. Полученный осадок ресуспендировали в гомогенизаторе Даунса в том же буферном растворе в 1/64 исходного объема и повторно осветляли центрифугированием на малой скорости (3500 об/мин, 8 мин, 4 °C). Очищенный и сконцентрированный вирусный препарат титровали с помощью реакции гемагглютинации (РГА) [20], а также оценивали 50% тканевое цитопатическое действие ТЦД₅₀/мл на культуре клеток аденокарциномы кишечника Сасо-2, и хранили при –80 °C.

Реакция вирус-нейтрализации

Реакцию вирус-нейтрализации проводили на культуре клеток аденокарциномы кишечника Сасо-2. Клетки культивировали на среде Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (*HyClone*, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки (*HyClone*, США) 2 г/л бикарбоната натрия (*ПанЭко*, Россия), пенициллина/стрептомицина 25000 Ед (*ПанЭко*, Россия) и 4 мМ L-глутамин (*ПанЭко*, Россия) при температуре 37 °C и 5% CO₂. Реакцию вирус-нейтрализации проводили в 96-луночном планшете при концентрации клеток (4–6)·10⁴ кл/лунку. Предварительно в 96-луночном планшете смешивали целевой вирус гриппа в количестве 10² ТЦД₅₀/лунку и двукратные разведения сывороток, сделанные в среде с 0.5% гидролизатом лактальбумина с солями Хенкса (*ПанЭко*, Россия). Полученную смесь инкубировали в течение 40 мин при 37 °C и добавляли к клеткам. Через 40 мин проводили смену среды на бессывороточную DMEM. Через 4–5 суток среду с планшета с клеточной культурой отбирали и оценивали в ней присутствие частиц вируса гриппа с помощью РГА [20]. Анализ проводили с четырехкратным повтором. Результаты реакции выражали с помощью 50% ингибирующей концентрации (ИК₅₀), представляющей собой количество антитела, ингибирующее вирус в 50% случаев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рАд5, экспрессирующих гены антител человека 27F3 и CR9114

Для разработки новой технологии получения рАТ в суспензионных эукариотических клетках, трансдуцированных рекомбинантными вирусными

векторами, экспрессирующими гены рАТ, нами была выбрана система «рекомбинантный вирусный вектор на основе аденовируса человека пятого серотипа для трансдукции суспензионной культуры клеток человека НЕК293». Такая система позволяет продуцировать антитела с наиболее близким к нативному для человека профилем гликозилирования и не требует дорогостоящих реактивов и трудоемкого метода трансфекции клеточной суспензии плазмидами. Ранее нами были опубликованы работы, где была показана возможность экспрессии гена рекомбинантного мини-антитела с использованием аденовирусного вектора в эукариотических клетках как *in vitro* [21], так и *in vivo* [22].

Мы провели литературный поиск моноклональных антител, которые могли бы послужить моделью для обрабатываемой технологии. В качестве модели мы решили выбрать антитела, специфичные к гемагглютинирующему вирусу гриппа, с известной третичной структурой и широким спектром действия, позволяющим выявлять вирусы гриппа различных субтипов. Как правило, наибольшей шириной спектра действия обладают антитела, взаимодействующие с консервативной, стволовой частью гемагглютинина. Из множества известных моноклональных антител к стволу гемагглютинина, четыре антитела (CR9114, 27F3, CR6261, F10) взаимодействуют с гемагглютинином только в комплементарных определяющих областях тяжелых цепей [23], что делает их удобной моделью для препаративного получения с помощью рекомбинантных аденовирусов, так как не требует создания отдельных конструкций, кодирующих легкие цепи, для каждого антитела. В качестве модельных нами были выбраны противогриппозные антитела 27F3 и CR9114, поскольку они имеют максимально широкий спектр распознавания. В литературе показана возможность антитела 27F3 взаимодействовать с гемагглютинином вирусов гриппа субтипов H1, H5, H6, H9, H11, H12, H13 и H16 подгруппы H1, и гемагглютининов H3, H7 и H10 подгруппы H3 [17]. Для антитела CR9114 показана способность взаимодействовать с гемагглютинами вирусов гриппа H1, H5, H9, H12, H13, H16 подгруппы H1 и гемагглютинами вирусов гриппа H3, H7, H10, H15 подгруппы H3, а также с различными вирусами гриппа В [18].

Антитела 27F3 и CR9114 взаимодействуют со стволовым доменом гемагглютинина вируса гриппа и относятся к классу антител VH1-69. Взаимодействие этого класса антител со своим эпитопом проходит при участии только тяжелой цепи [17]. Согласно литературным данным, для препаративного накопления с высоким выходом

дом тяжелой цепи антитела в эукариотических системах экспрессии, необходима экспрессия легкой цепи в эквивалентных количествах [7]. Поэтому нами были сконструированы три рАд5: рАд5, несущий ген тяжелой цепи антитела 27F3, рАд5, несущий ген тяжелой цепи антитела CR9114, а также рАд5, несущий ген легкой цепи антитела 27F3, который был предназначен для получения транзientной экспрессии как полноразмерного антитела 27F3, так и полноразмерного антитела CR9114.

Аминокислотные последовательности Fab-фрагментов тяжелой и легкой цепей антитела 27F3 и тяжелой цепи CR9114 были получены из белковой базы данных третичных структур – Protein Data Bank ID¹ (5WKO и 4FQH). На основании полученных аминокислотных последовательностей были построены нуклеотидные последовательности с кодонами, оптимизированными для экспрессии в клетках человека. Были разработаны генетические конструкции, в состав которых входил ген тяжелой или легкой цепи целевого антитела и лидерная последовательность секретируемой щелочной фосфатазы (secreted alkaline phosphatase, SEAP), необходимая для выхода антитела из клетки в культуральную среду. Схемы полученных конструкций представлены на рис. 1.

Рекомбинантные аденовирусы Ad5-27F3-H, Ad5-CR9114-H и Ad5-27F3-L получали в соответствии с инструкцией к набору AdEasy™ Adenoviral vector system (Agilent Stratagen, США). Препаративное накопление рекомбинантных аденовирусов проводили в адгезионной культуре эукариотических клеток линии HEK293. В результате были получены клеточные лизаты, содержащие рекомбинантные аденовирусы Ad5-27F3-L, Ad5-CR9114-H и Ad5-27F3-H, имеющие титры $2 \cdot 10^8$, $1 \cdot 10^8$ и $1 \cdot 10^8$ БОЕ/мл, соответственно.

Подбор условий для получения препаративного количества рАТ в культуре клеток HEK293

На следующем этапе работы были подобраны оптимальные условия для накопления в культуральной жидкости максимального уровня рАТ. Подбор условий проводили на примере рАТ r27F3 при трансдукции суспензионной линии клеток HEK293 рекомбинантными аденовирусами Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H. Клеточную суспензию с концентрацией $1 \cdot 10^6$ клеток/мл трансдуцировали разными количествами клеточных лизатов,

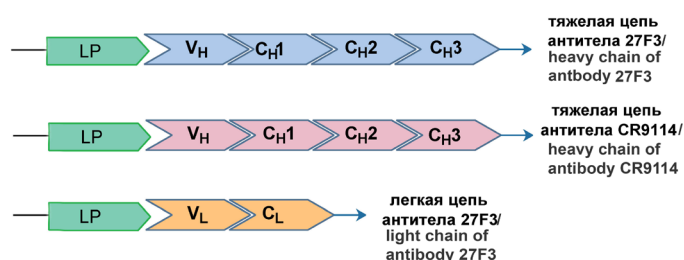


Рис. 1. Схематическое изображение генетических конструкций, кодирующих тяжелую цепь антитела 27F3, тяжелую цепь антитела CR914 и легкую цепь антитела 27F3. LP – лидерный пептид секретируемой щелочной фосфатазы SEAP; V_H – варибельный домен тяжелой цепи; V_L – варибельный домен легкой цепи; C_H – константный домен тяжелой цепи; C_L – константный домен легкой цепи.

Fig. 1. Schematic representation of the genetic constructs encoding the heavy chain of the 27F3 antibody, the heavy chain of the CR914 antibody, and the light chain of the 27F3 antibody. LP – secreted alkaline phosphatase SEAP leader peptide; V_H – heavy chain variable domain; V_L – light chain variable domain; C_H – heavy chain constant domain; C_L – light chain constant domain.

содержащих аденовирусные частицы Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H так, чтобы соотношение частиц было 1:1. Были использованы дозы рАд5 2 БОЕ/клетку каждого аденовируса, 20 и 200 БОЕ/клетку. Оценку количества целевого антитела в культуральной жидкости проводили при наступлении 30–40%, 50–60% и 100% ЦПД. Полученные образцы культуральной жидкости анализировали в дот-ИФА с помощью конъюгированных с пероксидазой антител к Fc-фрагменту IgG человека. Каждая точка эксперимента была повторена трижды. Результаты дот-ИФА были разделены на три группы: «–» – отсутствие окрашенной точки на мембране в месте внесения образца, «+» – присутствие окрашенной точки, «++» – присутствие яркой, хорошо заметной окрашенной точки. Полученные результаты подбора условий представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, оптимальными параметрами для накопления антитела r27F3 являются доза 200 БОЕ/клетку каждого рАд5 Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H, и наступление 50–60% ЦПД, что соответствует 3 суткам инкубации.

Дальнейшее накопление антитела r27F3 проводили при трансдукции клеточной суспензии 200 БОЕ/клетку каждого рАд5 Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H и антитела rCR9114 при трансдукции суспензии 200 БОЕ/клетку Ad5-27F3-L и Ad5-CR9114-H. Сбор культуральной жидкости проводили на третьи сутки инкубации при наступлении 50–60% ЦПД.

¹ <https://www.rcsb.org/docs/general-help/identifiers-in-pdb>. Дата обращения 20.01.2021. / Accessed January 20, 2021.

Таблица 1. Подбор условий препаративного накопления антитела r27F3 в культуральной жидкости после трансдукции культуры клеток HEK293 Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H**Table 1.** Selection of conditions for the preparative accumulation of the r27F3 antibody in the culture fluid after transduction of the HEK293 Ad5-27F3-L and Ad5-27F3-H cell culture

Количество вирусных частиц каждого рАд, БОЕ/клетку Number of viral particles of each rAd, PFU/cell	Среднее ЦПД, % Mean CPE, %	Время инкубации, сутки Incubation time, days	Результаты дот-ИФА Dot-ELISA results
2	36.5	6	–
2	56.2	7	–
2	100	9	–
20	37.2	4	–
20	53.4	5	+
20	100	7	–
200	40.1	2	+
200	56.5	3	++
200	100	5	–

Получение препаративных количеств рАТ r27F3 и rCR9114, хроматографическая очистка и анализ полипептидного спектра очищенных антител

На следующем этапе работы препараты рАТ r27F3 и rCR9114 были накоплены в препаративных количествах и очищены из культуральной жидкости хроматографическим методом на колонке с аффинным сорбентом MabSelect™ SuRe™ (Cytiva, США). Финальную очистку рАТ и замену буфера проводили при помощи гель-фильтрации с использованием сорбента Superdex® 200 pg (Cytiva, США). Такой подход для очистки рАТ использовался нами ранее [24] и позволяет получать препараты рАТ высокой степени очистки, достаточной для дальнейших лабораторных исследований *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, для нивелирования потенциального риска загрязнения препаратов рекомбинантными аденовирусами, используемыми для трансдукции клеток, препараты после финальной очистки были профильтрованы через противовирусные фильтры Viresolve® Pro (Millipore, США), имеющие размер пор 20 нм и позволяющие эффективно избавляться как от оболочечных, так и от безоболочечных вирусов.

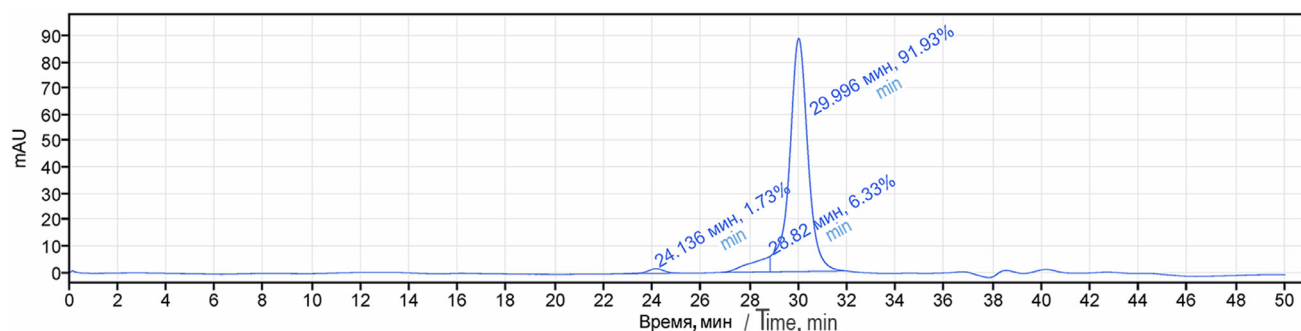
В результате из 4 л культуральной жидкости было получено 12 мг рАТ r27F3 и 10 мг рАТ rCR9114. Препарат очищенного рАТ r27F3 имел концентрацию 1.12 мг/мл, а препарат очищенного рАТ rCR9114 имел концентрацию 0.56 мг/мл.

При изучении очищенных препаратов рАТ r27F3 и rCR9114 методом ВЭЖХ были получены следующие результаты, представленные на рис. 2 и 3.

В результате была продемонстрирована высокая степень чистоты полученных препаратов (более 90%). Разница по высоте и площади пиков рАТ r27F3 и rCR9114 связана с их различной концентрацией в препарате. Кроме того, было продемонстрировано различное время удерживания основных пиков в препаратах r27F3 и rCR9114, что указывает на различный гидродинамический радиус у двух данных молекул. По всей видимости, рАТ rCR9114 обладает значительно более объемной пространственной структурой и появляется на хроматограмме более ранним пиком по сравнению с r27F3.

Анализ полипептидного спектра препаративно очищенных антител проводили методом белкового электрофореза в ПААГ-ДСН. Для оценки способности антител формировать комплекс тяжелой и легкой цепи (H+L) использовали «плюс–минус» модификацию обработки образца, т.е. денатурирующие (+) и неденатурирующие (–) условия. Такая модификация позволяет идентифицировать молекулярную массу как тяжелой и легкой цепей по отдельности, так и секретируемого функционального комплекса IgG (H+L).

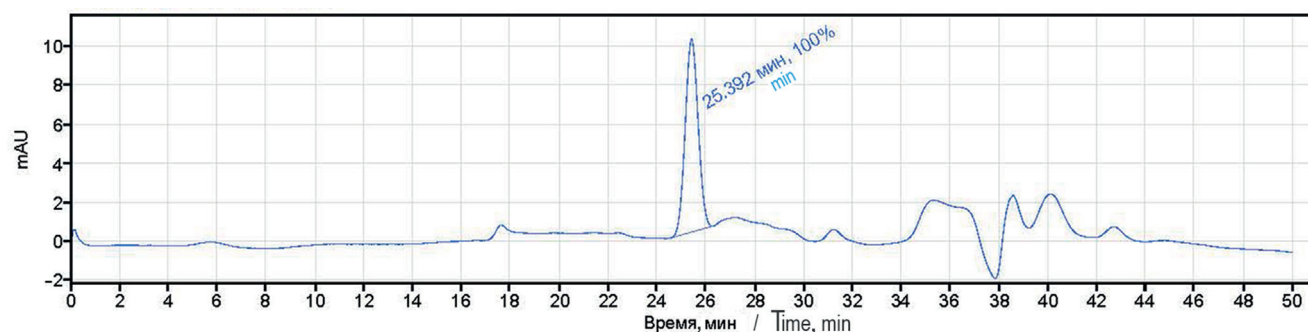
Результаты электрофореза в ПААГ-ДСН представлены на рис. 4. В денатурирующих условиях наблюдались два фрагмента весом ~55 кДа



Результаты для пика (Процент площади 1%) / Results for peak (Area percentage 1%)

Время удержания, мин Retention time, min	Описание сигнала Signal description	Ширина, мин Width, min	Площадь Area	Высота Height	Площадь, % Area, %
24.136		2.985	88.1	1.8	1.73
28.820	DAD1A, Sig = 280.4, Ref = 360.1	2.046	322.1	5.9	6.33
29.996		3.138	4674.8	88.8	91.93

Рис. 2. Хроматограмма ВЭЖХ очищенного антитела r27F3, а также процентное содержание целевого и примесных пиков.
Fig. 2. HPLC chromatogram of the purified r27F3 antibody, as well as the percentage of the target and impurity peaks.



Результаты для пика (Процент площади 1%) / Results for peak (Area percentage 1%)

Время удержания, мин Retention time, min	Описание сигнала Signal description	Ширина, мин Width, min	Площадь Area	Высота Height	Площадь, % Area, %
25.392	DAD1A, Sig = 280.4, Ref = 360.1	1.713	366.2	9.9	100.0

Рис. 3. Хроматограмма ВЭЖХ очищенного антитела rCR9114, а также процентное содержание целевого и примесных пиков.
Fig. 3. HPLC chromatogram of the purified rCR9114 antibody, as well as the percentage of the target and impurity peaks.

и 25 кДа, что соответствует молекулярной массе Н и L-цепей антитела. В неденатурирующих условиях наблюдался один фрагмент массой 160 кДа, что соответствует полному комплексу IgG. Также показано, что полученные препараты рАТ имеют высокую степень электрофоретической чистоты.

Изучение активности и специфичности рАТ r27F3 и rCR9114

Fab-специфичность рекомбинантных противогриппозных антител анализировали с помощью вестерн-блоттинга. В качестве антигенов использовали панель очищенных вирусов гриппа А и В. Образцы для проведения вестерн-блоттинга обрабатывали в неденатурирующих условиях.

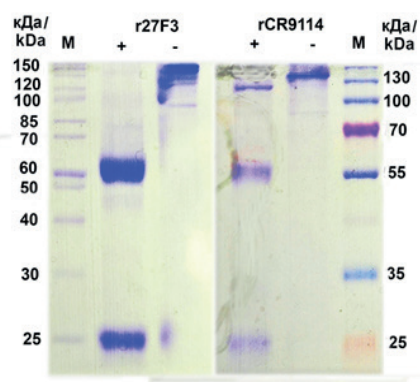


Рис. 4. Электрофореграмма очищенных антител r27F3 и rCR9114:
 М – маркеры молекулярного веса; «+» – денатурирующие условия; «-» – неденатурирующие условия.

Fig. 4. Electropherogram of purified r27F3 and rCR9114 antibodies. M are markers of molecular weight; “+” are denaturing conditions; “-” are non-denaturing conditions.

На рис. 5 представлены результаты вестерн-блоттинга с pAT r27F3, на рис. 6 – с pAT rCR9114.

По данным иммуноблоттинга (рис. 5) антитело r27F3 обладает широкой гетеросубтипической специфичностью, взаимодействует с гемагглютинидами вирусов гриппа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7, Н9 и не взаимодействует с гемагглютинином вируса гриппа А субтипа Н2 и вирусами гриппа В. Полученная специфичность для антитела r27F3 полностью соответствует литературным данным [17].

Согласно данным иммуноблоттинга (рис. 6) антитело rCR9114 также обладает широкой специфичностью, взаимодействует с гемагглютинидами вирусов гриппа А субтипов Н1, Н5 и Н9, относящихся к подгруппе 1 [18] (за исключением вируса гриппа субтипа Н2) и вирусами гриппа В как линии Виктория, так и линии Ямагата, но при этом не взаимодействует с вирусами гриппа субтипов Н3 и Н7, относящихся к подгруппе 2 [25]. Согласно литературным

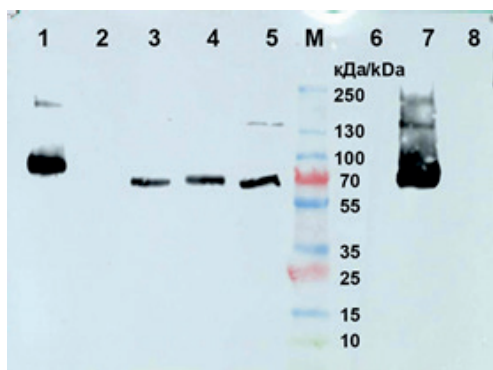


Рис. 5. Вестерн-блот анализ Fab-специфичности очищенного антитела r27F3.

М – маркер молекулярного веса;

цифрами обозначены вирусы гриппа:

- 1 – A/California/04/09 (H1N1);
- 2 – A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3);
- 3 – A/Aichi/2/68 (H3N2);
- 4 – A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
- 5 – A/Chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2);
- 6 – B/Phuket/3073/13;
- 7 – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2);
- 8 – B/Washington/20/2019.

Fig. 5. Western blot analysis of the Fab specificity of the purified r27F3 antibody. M is marker of molecular weight; the numbers indicate influenza viruses:

- 1 – A/California/04/09 (H1N1);
- 2 – A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3);
- 3 – A/Aichi/2/68 (H3N2);
- 4 – A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
- 5 – A/Chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2);
- 6 – B/Phuket/3073/13;
- 7 – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2);
- 8 – B/Washington/20/2019.

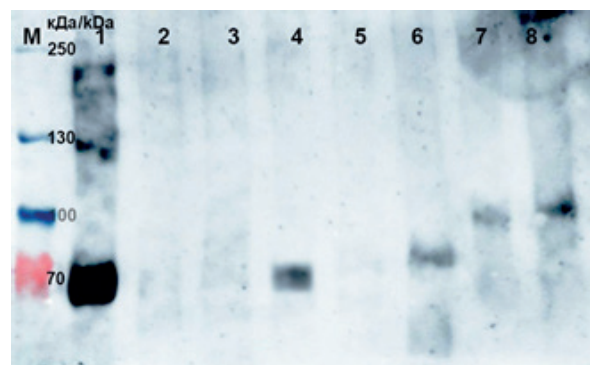


Рис. 6. Вестерн-блот анализ Fab-специфичности очищенного антитела rCR9114:

М – маркер молекулярного веса;

цифрами обозначены вирусы гриппа:

- 1 – A/California/04/09 (H1N1);
- 2 – A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3);
- 3 – A/Aichi/2/68 (H3N2);
- 4 – A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
- 5 – A/Chicken/Moscow/NJ294598-12/2004 (H7N2);
- 6 – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2);
- 7 – B/Phuket/3073/13; 8 – B/Washington/20/2019.

Fig. 6. Western blot analysis of the Fab specificity of the purified rCR9114 antibody: M is marker of molecular weight; the numbers indicate influenza viruses:

- 1 – A/California/04/09 (H1N1);
- 2 – A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3);
- 3 – A/Aichi/2/68 (H3N2);
- 4 – A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
- 5 – A/Chicken/Moscow/NJ294598-12/2004 (H7N2);
- 6 – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2);
- 7 – B/Phuket/3073/13; 8 – B/Washington/20/2019.

данным, антитело CR9114 обладает способностью связываться с гемагглютинидами вирусов гриппа А, относящимся к подгруппе 2, причем константы диссоциации K_d комплексов антиген-антитело (1.1–2.2) сравнимы с K_d при взаимодействии с гемагглютинидами вирусов гриппа В линии Ямагата (1.3–1.8) и меньше K_d вирусов гриппа В линии Виктория (1.5–4.8) [18]. Возможным объяснением отсутствия взаимодействия полученного нами антитела rCR9114 с вирусами гриппа, относящимися к подгруппе 2, является то, что данное антитело имело легкую цепь антитела 27F3. Легкая цепь антитела 27F3 принадлежит к типу каппа подгруппы 3, в то время как легкая цепь антитела CR9114 относится к типу лямбда подгруппы 1. Несмотря на то, что связывание с антигеном для CR9114 происходит только за счет тяжелой цепи, легкая цепь может участвовать в перераспределении энергии в пределах тяжелых цепей, что вносит свой вклад в конформацию отдельных участков тяжелой цепи и взаимодействие с антигеном. Возможно, именно наличие легкой цепи другого антитела не позволило

Таблица 2. Результаты реакции вирус-нейтрализации антител r27F3 и rCR9114 с вирусами гриппа А и В.
Н.Д. – вирус-нейтрализация не детектируется
Table 2. Results of the virus neutralization assay of r27F3 and rCR9114 antibodies with influenza A and B viruses.
N.D. – neutralization is not detected

Вирус гриппа Influenza virus	ИК ₅₀ (мкг/мл) IK ₅₀ (μg/mL)	
	r27F3	rCR9114
A/California/04/09 (H1N1)	2.8	5.6
A/Aichi/2/68 (H3N2)	Н.Д. N.D.	Н.Д. N.D.
A/Duck/Pensylvania/10218/84 (H5N2)	1.4	1.4
A/Chicken/Moscow/NJ294598-12/2004 (H7N2)	11.2	Н.Д. N.D.
A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2)	2.8	2.8
B/Phuket/3073/13	Н.Д. N.D.	Н.Д. N.D.
B/Washington/20/2019	Н.Д. N.D.	Н.Д. N.D.

антителу rCR9114 достаточно эффективно связаться с вирусами гриппа А, относящимися к подгруппе 2.

Специфичность антител r27F3 и rCR9114 была также оценена с помощью реакции вирус-нейтрализации. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Согласно литературным данным, антитело 27F3 в реакции микронейтрализации способно нейтрализовать вирусы гриппа H1N1, H5N1, и H6N1, относящиеся к подгруппе 1, и вирусы гриппа H3N2, H7N9 и H10N8, относящиеся к подгруппе 2 [17]. Согласно табл. 2, антитело r27F3 нейтрализует вирусы гриппа А из подгруппы 1 H1N1, H5N2 и H9N2 и вирус гриппа А из подгруппы 2 H7N2. Не удалось детектировать нейтрализацию вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) из подгруппы 2, хотя антитело было способно взаимодействовать с ним по данным иммуноблоттинга.

Способность антитела rCR9114 связывать антигены посредством реакции вирус-нейтрализации полностью соответствует литературным данным [18]. Антитело rCR9114 нейтрализует вирусы гриппа А, относящиеся к подгруппе 1, нейтрализацию вирусов гриппа А из подгруппы 2 и вирусов гриппа В детектировать не удалось.

Таким образом было показано, что антитело r27F3, полученное с помощью аденовирусных

векторов, демонстрирует способность связываться с вирусами гриппа А субтипов H1N1, H3N2, H5N2, H9N2, но не демонстрирует способность связываться с вирусом гриппа А субтипа H2N3 и вирусами гриппа В, как и было описано в литературе [18].

Антитело rCR9114 также показало способность взаимодействовать с вирусами гриппа А, относящимися к подгруппе 1 (H1N1, H5N2, H9N2, но не H2N3), но не к подгруппе 2 (H3N2, H7N2), а кроме того, было способно связываться с вирусами гриппа В как линии Виктория, так и линии Ямагата. Возможно, замена собственной легкой цепи антитела rCR9114 на легкую цепь антитела r27F3 повлияло на функциональную активность антитела и послужила причиной потери способности связываться с вирусами гриппа А, относящимися к подгруппе 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами были получены рекомбинантные аденовирусы человека пятого серотипа, несущие гены тяжелых цепей противогриппозных антител 27F3 и CR9114, а также рекомбинантный аденовирус человека, несущий ген легкой цепи антитела 27F3. Были отработаны условия заражения суспензионной линии клеток HEK293

полученными рекомбинантными аденовирусами и показано, что оптимальными условиями для получения максимального выхода антитела являются доза каждого рАд5, несущих гены тяжелой и легкой цепи рАТ, 200 БОЕ/клетку, и совместная инкубация вирусов и клеток в течение 3 суток до наступления 50–60% ЦПД (табл. 1). Полученные в результате трансдукции клеточной суспензии аденовирусами рАТ были очищены из культуральной жидкости с помощью хроматографического метода, выход рАТ составил 12 мг из 4 л культуральной жидкости для r27F3 и 10 мг для rCR9114. рАТ полностью соответствовали нативным по молекулярной массе (рис. 4) и были способны реагировать со вторичными антителами к Fc-фрагменту IgG человека. Функциональная активность полученных рАТ была оценена с помощью вестерн-блоттинга и реакции вирус-нейтрализации с использованием вирусов гриппа А и В различных субтипов. Функциональная активность антитела r27F3 соответствовала функциональной активности нативного антитела 27F3, тогда как антитело rCR9114 потеряло способность взаимодействовать с вирусами гриппа А, относящимися к подгруппе 2 (H3N2 и H7N2), что возможно связано с заменой легкой цепи антитела CR9114 на легкую цепь антитела 27F3.

Таким образом, с помощью описываемой нами технологии были получены в препаративных количествах и очищены два противогриппозных антитела широкого спектра действия. Данную технологию можно использовать для получения очищенных препаратов человеческих рАТ в случаях, когда гликозилирование антитела является принципиальным моментом.

Вклад авторов

М.М. Шмаров, Д.Н. Щербинин – идея, концепция и дизайн исследования;

М.М. Шмаров – утверждение окончательной версии статьи для публикации;

Е.С. Седова – интерпретация результатов исследования, написание и доработка текста;

А.А. Лысенко, И.Б. Есмагамбетов – консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ;

Д.Н. Щербинин, К.А. Первойкина, Е.А. Богачева – проведение работ по получению рекомбинантного аденовируса;

Н.Ю. Вискова – накопление препаративных количеств рекомбинантных антител в культуральной жидкости;

И.Б. Есмагамбетов, В.В. Прокофьев, Е.И. Рябова – препаративное выделение рекомбинантных антител из культуральной жидкости и ВЭЖХ-ГФ;

Л.В. Верховская, Е.Д. Авдонина, А.С. Бандельюк, А.А. Лысенко – дот-иммуноферментный анализ, электрофорез белков в полиакриламидном геле, постановка вестерн-блот анализа;

А.С. Бандельюк, Е.С. Седова – накопление и концентрирование вирусов гриппа и постановка реакции вирус-нейтрализации.

Authors' contributions

M.M. Shmarov, D.N. Shcherbinin – idea, concept, and design of the study;

M.M. Shmarov – approval of the final version of the article for publication;

E.S. Sedova – interpretation of the research results, writing the text of the article;

A.A. Lysenko, I.B. Esmagambetov – consultation on the issues of conducting individual stages of experimental work;

D.N. Shcherbinin, K.A. Pervoyakina, E.A. Bogacheva – recombinant adenovirus production;

N.Yu. Viskova – production of preparative amounts of recombinant antibodies in the culture fluid;

I.B. Esmagambetov, V.V. Prokofiev, E.I. Ryabova – preparative isolation of recombinant antibodies from the culture liquid and HPLC–gel-filtration;

L.V. Verkhovskaya, E.D. Avdonina, A.S. Bandelyuk, A.A. Lysenko – dot blot, protein electrophoresis in polyacrylamide gel, Western blot analysis;

A.S. Bandelyuk, E.S. Sedova – accumulation and concentration of influenza viruses and conducting virus neutralization assay.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaplon H., Chenoweth A., Crescioli S., Reichert J.M. Antibodies to watch in 2022. *MAbs*. 2022 Jan-Dec. 2022;14(1):2014296. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2014296>
2. Kumar R., Paray H.A., Shrivastava T., Sinha S., Luthra K. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;135:907–918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006>

REFERENCES

1. Kaplon H., Chenoweth A., Crescioli S., Reichert J.M. Antibodies to watch in 2022. *MAbs*. 2022 Jan-Dec. 2022;14(1):2014296. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2014296>
2. Kumar R., Paray H.A., Shrivastava T., Sinha S., Luthra K. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;135:907–918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006>

3. Альтшулер Е.П., Серебряная Д.В., Катруха А.Г. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. *Успехи биологической химии*. 2010;50:203–258. URL: <https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/Altschuler.pdf>
4. Yu J., Guo Y., Gu Y., Fan X., Li F., Song H., Nian R., Liu W. A novel silk fibroin protein-based fusion system for enhancing the expression of nanobodies in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022;106(5–6):1967–1977. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11857-7>
5. Garvey M. Non-mammalian eukaryotic expression systems yeast and fungi in the production of biologics. *J. Fungi (Basel)*. 2022;8(11):1179. <https://doi.org/10.3390/jof8111179>
6. Vazquez-Lombardi R., Nevoltris D., Luthra A., Schofield P., Zimmermann C., Christ D. Transient expression of human antibodies in mammalian cells. *Nat. Protoc.* 2019;13:99–117. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.126>
7. Korn J., Schäckermann D., Kirmann T., Bertoglio F., Steinke S., Heisig J., Ruschig M., Rojas G., Langreder N., Wenzel E.V., Roth K.D.R., Becker M., Meier D., van den Heuvel J., Hust M., Dübel S., Schubert M. Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. *Sci Rep.* 2020;10(1):21393. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78425-9>
8. Huang Y.M., Hu W., Rustandi E., Chang K., Yusuf-Makagiansar H., Ryll T. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol. Prog.* 2010;26(5):1400–1410. <https://doi.org/10.1002/btpr.436>
9. Gupta K., Parasnis M., Jain R., Dandekar P. Vector-related stratagems for enhanced monoclonal antibody production in mammalian cells. *Biotechnol. Adv.* 2019;37(8):107415. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107415>
10. Jäger V., Büsow K., Wagner A., Weber S., Hust M., Frenzel A., Schirrmann T. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 2013;13:52. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-52>
11. Kim T.K., Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;397(8):3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
12. Croset A., Delafosse L., Gaudry J.P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., Chevalet L., Antonsson B. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J. Biotechnol.* 2012;161(3):336–348. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.038>
13. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
14. König J., Hust M., van den Heuvel J. Validation of the Production of Antibodies in Different Formats in the HEK₂₉₃ Transient Gene Expression System. *Methods Mol. Biol.* 2021;2247:59–76. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1126-5_4
15. Рябова Е.И., Деркаев А.А., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Довгий М.А., Бырихина Д.В., Прокофьев В.В., Чемоданова И.П. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>
3. Al'tshuler E.P., Serebryanaya D.V., Katrukha A.G. Obtaining recombinant antibodies and methods for increasing their affinity. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 2010;50:203–258 (in Russ.). URL: <https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/Altschuler.pdf>
4. Yu J., Guo Y., Gu Y., Fan X., Li F., Song H., Nian R., Liu W. A novel silk fibroin protein-based fusion system for enhancing the expression of nanobodies in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022;106(5–6):1967–1977. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11857-7>
5. Garvey M. Non-mammalian eukaryotic expression systems yeast and fungi in the production of biologics. *J. Fungi (Basel)*. 2022;8(11):1179. <https://doi.org/10.3390/jof8111179>
6. Vazquez-Lombardi R., Nevoltris D., Luthra A., Schofield P., Zimmermann C., Christ D. Transient expression of human antibodies in mammalian cells. *Nat. Protoc.* 2019;13:99–117. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.126>
7. Korn J., Schäckermann D., Kirmann T., Bertoglio F., Steinke S., Heisig J., Ruschig M., Rojas G., Langreder N., Wenzel E.V., Roth K.D.R., Becker M., Meier D., van den Heuvel J., Hust M., Dübel S., Schubert M. Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. *Sci Rep.* 2020;10(1):21393. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78425-9>
8. Huang Y.M., Hu W., Rustandi E., Chang K., Yusuf-Makagiansar H., Ryll T. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol. Prog.* 2010;26(5):1400–1410. <https://doi.org/10.1002/btpr.436>
9. Gupta K., Parasnis M., Jain R., Dandekar P. Vector-related stratagems for enhanced monoclonal antibody production in mammalian cells. *Biotechnol. Adv.* 2019;37(8):107415. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107415>
10. Jäger V., Büsow K., Wagner A., Weber S., Hust M., Frenzel A., Schirrmann T. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 2013;13:52. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-52>
11. Kim T.K., Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;397(8):3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
12. Croset A., Delafosse L., Gaudry J.P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., Chevalet L., Antonsson B. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J. Biotechnol.* 2012;161(3):336–348. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.038>
13. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
14. König J., Hust M., van den Heuvel J. Validation of the Production of Antibodies in Different Formats in the HEK₂₉₃ Transient Gene Expression System. *Methods Mol. Biol.* 2021;2247:59–76. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1126-5_4
15. Ryabova E.I., Derkaev A.A., Esmagamбетов И.Б., Shcheblyakov D.V., Dovgii M.A., Byrikhina D.V., Prokof'ev V.V., Chemodanova I.P. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):266–278 (in Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>

16. Greber U.F., Gomez-Gonzalez A. Adenovirus – a blueprint for gene delivery. *Curr. Opin. Virol.* 2021;48:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.006>
17. Lang S., Xie J., Zhu X., Wu N.C., Lerner R.A., Wilson I.A. Antibody 27F3 broadly targets influenza A group 1 and 2 hemagglutinins through a further variation in V_H1-69 antibody orientation on the HA stem. *Cell Rep.* 2017;20(12):2935–2943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.084>
18. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgeest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., van der Vlugt R., Lamrani M., Korse H.J., Geelen E., Sahin Ö., Sieuwerts M., Brakenhoff J.P., Vogels R., Li O.T., Poon L.L., Peiris M., Koudstaal W., Ward A.B., Wilson I.A., Goudsmit J., Friesen R.H. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science.* 2012;337(6100):1343–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1222908>
19. Tutykhina I., Esmagambetov I., Bagaev A., Pichugin A., Lysenko A., Shcherbinin D., Sedova E., Logunov D., Shmarov M., Ataulakhov R., Naroditsky B., Gintsburg A. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
20. Шубладзе А.К., Гайдамович С.Я. *Краткий курс практической вирусологии.* М.: Медгиз; 1954. 272 с.
21. Грибова И.Ю., Тиллиб С.В., Тутыхина И.Л., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Верховска Л.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Эффективная экспрессия наноантител рекомбинантным аденовирусным вектором *in vitro*. *Acta Naturae.* 2011;3(3):66–72.
22. Tutykhina I.L., Sedova E.S., Gribova I.Y., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Tillib S.V., Gintsburg A.L. Passive immunization with a recombinant adenovirus expressing an HA (H5)-specific single-domain antibody protects mice from lethal influenza infection. *Antiviral. Res.* 2013;97(3):318–328. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.021>
23. Щербинин Д.Н., Алексеева С.В., Шмаров М.М., Смирнов Ю.А., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Анализ В-клеточных эпитопов гемагглютинина вирусов гриппа. *Acta Naturae.* 2016;8(1):13–20. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-13-20>
24. Есмагамбетов И.Б., Шебляков Д.В., Егорова Д.А., Воронина О.Л., Деркаев А.А., Воронина Д.В., Попова О., Рябова Е.И., Щербинин Д.Н., Аксенова Е.И., Семенов А.Н., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Зубкова О.В., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Борисевич С.В., Гинцбург А.Л. Наноантитела – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>
25. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., ter Meulen J., Lasters I., Carsetti R., Peiris M., de Kruif J., Goudsmit J. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM⁺ memory B cells. *PLoS One.* 2008;3(12):e3942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003942>
16. Greber U.F., Gomez-Gonzalez A. Adenovirus – a blueprint for gene delivery. *Curr. Opin. Virol.* 2021;48:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.006>
17. Lang S., Xie J., Zhu X., Wu N.C., Lerner R.A., Wilson I.A. Antibody 27F3 broadly targets influenza A group 1 and 2 hemagglutinins through a further variation in V_H1-69 antibody orientation on the HA stem. *Cell Rep.* 2017;20(12):2935–2943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.084>
18. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgeest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., van der Vlugt R., Lamrani M., Korse H.J., Geelen E., Sahin Ö., Sieuwerts M., Brakenhoff J.P., Vogels R., Li O.T., Poon L.L., Peiris M., Koudstaal W., Ward A.B., Wilson I.A., Goudsmit J., Friesen R.H. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science.* 2012;337(6100):1343–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1222908>
19. Tutykhina I., Esmagambetov I., Bagaev A., Pichugin A., Lysenko A., Shcherbinin D., Sedova E., Logunov D., Shmarov M., Ataulakhov R., Naroditsky B., Gintsburg A. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
20. Shubladze A.K., Gaidamovich S.Ya. *Kratkii kurs prakticheskoi virusologii (Short Course of Practical Virology).* Moscow: Medgiz; 1954. 273 p. (in Russ.).
21. Gribova I.Yu., Tillib S.V., Tutykhina I.L., Shmarov M.M., Logunov D.Yu., Verkhovska L.V., Naroditskii B.S., Gintsburg A.L. Effective Genetic Expression of Nanoantibodies by Recombinant Adenoviral Vector *in vitro*. *Acta Naturae.* 2011;3(3):64–70.
22. Tutykhina I.L., Sedova E.S., Gribova I.Y., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Tillib S.V., Gintsburg A.L. Passive immunization with a recombinant adenovirus expressing an HA (H5)-specific single-domain antibody protects mice from lethal influenza infection. *Antiviral. Res.* 2013;97(3):318–328. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.021>
23. Shcherbinin D.N., Alekseeva S.V., Shmarov M.M., Smirnov Yu.A., Naroditskii B.S., Gintsburg A.L. The Analysis of B-Cell Epitopes of Influenza Virus Hemagglutinin. *Acta Naturae.* 2016;8(1):13–20. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-13-20>
24. Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Egorova D.A., *et al.* Nanobodies Are Potential Therapeutic Agents for the Ebola Virus Infection. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>
25. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., ter Meulen J., Lasters I., Carsetti R., Peiris M., de Kruif J., Goudsmit J. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM⁺ memory B cells. *PLoS One.* 2008;3(12):e3942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003942>

Об авторах:

Седова Елена Сергеевна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: sedova-es@yandex.ru. Scopus Author ID 36341354100, ResearcherID S-4206-2017, SPIN-код РИНЦ 7104-6582, <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Щербинин Дмитрий Николаевич, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: dim284@inbox.ru. Scopus Author ID 36599350900, ResearcherID E-7682-2014, SPIN-код РИНЦ 7743-6517, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Банделюк Алина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: alinabond88@mail.ru. Scopus Author ID 56290408700, ResearcherID D-9771-2014, SPIN-код РИНЦ 1125-9816, <https://orcid.org/0000-0001-8453-797X>

Верховская Людмила Викторовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: verkhov@mail.ru. SPIN-код РИНЦ 5529-5909, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Вискова Наталья Юрьевна, научный сотрудник лаборатории клеточной микробиологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: apr2004@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6476-3520>

Авдонина Елена Дмитриевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: avdonina.yelena@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8059-9743>

Прокофьев Владимир Владимирович, лаборант-исследователь лаборатории иммунобиотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: vladimir.prokofev2609@gmail.com. Scopus Author ID 57300704700, SPIN-код РИНЦ 2336-1087, <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

Рябова Екатерина Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: ryabovaei96@gmail.com. Scopus Author ID 57301278100, ResearcherID AAE-7335-2022, SPIN-код РИНЦ 6963-1376, <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: esmagambetov@gmail.com. Scopus Author ID 56120429700, ResearcherID E-3327-2014, SPIN-код РИНЦ 8132-2320, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Первойкина Кристина Алексеевна, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: uk-ru123@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0780-5998>

Богачева Елена Александровна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: boga4eva85@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9289-3608>

Лысенко Андрей Александрович, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: andrei.a.lysenko@yandex.ru. Scopus Author ID 55573757600, SPIN-код РИНЦ 7830-3830, <https://orcid.org/0000-0002-0230-1822>

Шмаров Максим Михайлович, д.б.н., заведующий лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: ribozym@mail.ru. Scopus Author ID 6507322279, ResearcherID D-8662-2014, SPIN-код РИНЦ 4874-2578, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

About the authors:

Elena S. Sedova, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: sedova-es@yandex.ru. Scopus Author ID 36341354100, ResearcherID S-4206-2017, RSCI SPIN-code 7104-6582, <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Dmitriy N. Shcherbinin, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: dim284@inbox.ru. Scopus Author ID 36599350900, ResearcherID E-7682-2014, RSCI SPIN-code 7743-6517, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Alina S. Bandelyuk, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: alinabond88@mail.ru. Scopus Author ID 56290408700, ResearcherID D-9771-2014, RSCI SPIN-code 1125-9816, <https://orcid.org/0000-0001-8453-797X>

Ludmila V. Verkhovskaya, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: verkhov@mail.ru. RSCI SPIN-code 5529-5909, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Natalia Yu. Viskova, Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: apr2004@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6476-3520>

Elena D. Avdonina, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: avdonina.yelena@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8059-9743>

Vladimir V. Prokofiev, Laboratory Assistant-Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: vladimir.prokofiev2609@gmail.com. Scopus Author ID 57300704700, RSCI SPIN-code 2336-1087, <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

Ekaterina I. Ryabova, Junior Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: ryabovaei96@gmail.com. Scopus Author ID 57301278100, ResearcherID AAE-7335-2022, RSCI SPIN-code 6963-1376, <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>

Ilias B. Esmagambetov, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: esmagambetov@gmail.com. Scopus Author ID 56120429700, ResearcherID E-3327-2014, RSCI SPIN-code 8132-2320, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Kristina A. Pervoykina, Laboratory Assistant-Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: uk-ru123@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0780-5998>

Elena A. Bogacheva, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: boga4eva85@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9289-3608>

Andrei A. Lysenko, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: andrei.a.lysenko@yandex.ru. Scopus Author ID 55573757600, RSCI SPIN-code 7830-3830, <https://orcid.org/0000-0002-0230-1822>

Maksim M. Shmarov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: ribozym@mail.ru. Scopus Author ID 6507322279, ResearcherID D-8662-2014, RSCI SPIN-code 4874-2578, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

*Поступила: 11.10.2022; получена после доработки: 28.11.2022; принята к опубликованию: 11.01.2023.
The article was submitted: October 11, 2022; approved after reviewing: November 28, 2022; accepted for publication: January 11, 2023.*

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
В ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**
**ANALYTICAL METHODS IN CHEMISTRY
AND CHEMICAL TECHNOLOGY**

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-65-74>



УДК 543.9

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

**Определение возможных микроРНК-маркеров злоупотребления
препаратами кобальта методом ПЦР в реальном времени
с использованием панелей сигнального пути гипоксии**

П.В. Постников^{1,✉}, Ф.В. Радус², Ю.А. Ефимова², И.В. Пронина^{1,3}

¹Национальная антидопинговая лаборатория (Институт) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (НАДЛ МГУ), Москва, 105005 Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

³Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: drpavelpostnikov@gmail.com

Аннотация

Цели. Кобальт имитирует состояние гипоксии, препятствуя деградации альфа-субъединицы гипоксия-индуцируемого фактора, что приводит к увеличению кислородной емкости крови и может использоваться спортсменами в качестве допинга для получения конкурентных преимуществ. На сегодняшний момент для определения общего кобальта в организме используют прямые методы масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии, однако Всемирным антидопинговым агентством не установлена максимально допустимая пороговая концентрация этого элемента в биожидкостях. Отсутствие четких критериев идентификации осложняет интерпретацию полученных результатов. В связи с этим, в данной статье впервые предлагается подход по косвенному определению возможных злоупотреблений кобальтом для целей допинг-контроля, основанный на изменении уровней экспрессии микроРНК, задействованных в регуляции сигнального пути гипоксии. Цель исследования заключалась в поиске возможных микроРНК-маркеров, экспрессия которых не зависит от гипоксии, вызванной физическими нагрузками, но заметно изменяется при приеме препаратов кобальта.

Методы. Выделение микроРНК из образцов плазмы крови проводили при помощи набора PAXgene Blood miRNA Kit. Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на амплификаторе CFX96 Bio-Rad (США) с помощью наборов miScript® SYBR® Green PCR Kit и панелей для исследования профилей экспрессии зрелых микроРНК сигнального пути гипоксии Hypoxia Signaling Pathway miScript® miRNA PCR Array.

Результаты. На основании статистического анализа данных было установлено, что экспрессия hsa-miR-15b-5p в плазме крови испытуемых не зависит от физической нагрузки, но возрастает при приеме препаратов кобальта.

Выводы. Разница в уровнях экспрессии при гипоксии, вызванной анаэробной физической нагрузкой, и имитацией гипоксии за счет применения кобальта делает hsa-miR-15b-5p потенциальным претендентом на роль маркера злоупотребления данным эритропоэз-стимулирующим агентом.

Ключевые слова: кобальт, qPCR-RT, микроРНК, допинг-контроль, стимуляторы эритропоэза

Для цитирования: Постников П.В., Радус Ф.В., Ефимова Ю.А., Пронина И.В. Определение возможных микроРНК-маркеров злоупотребления препаратами кобальта методом ПЦР в реальном времени с использованием панелей сигнального пути гипоксии. *Тонкие химические технологии*. 2023;18(1):65–74. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-65-74>

RESEARCH ARTICLE

Determination of possible microRNA-markers of cobalt abuse by real-time qPCR using hypoxia signaling pathway panels

Pavel V. Postnikov^{1,✉}, Fedor V. Radus², Yulia A. Efimova², Irina V. Pronina^{1,3}

¹National Anti-Doping Laboratory (Institute), M.V. Lomonosov Moscow State University (NADL MSU), Moscow, 105005 Russia

²MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

³Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

✉Corresponding author, e-mail: drpavelpostnikov@gmail.com

Abstract

Objectives. Cobalt mimics the state of hypoxia to prevent degradation of the alpha subunit of hypoxia-inducible factor, resulting in an increase in blood oxygen capacity and endurance. Athletes can use this property to gain competitive advantage. Nowadays, direct methods of inductively coupled plasma mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry are used to determine total cobalt levels in the body. However, the World Anti-Doping Agency is yet to establish a maximum allowable threshold concentration of this element in biofluids. The lack of clear identification criteria complicates the interpretation of the obtained results for the purposes of doping control. In this regard, the present work proposes a new approach for the indirect determination of possible cobalt abuse based on changes in the expression levels of miRNAs involved in the regulation of hypoxia signaling pathways. Here, the aim is to identify possible microRNA markers whose expression does not depend on exercise-induced hypoxia, but changes markedly when taking cobalt preparations.

Methods. MicroRNA isolation was performed from blood plasma samples using the PAXgene Blood miRNA Kit. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on CFX96 Bio-Rad (USA) analyzer using miScript® SYBR® Green PCR Kits and panels for studying the expression profiles of mature microRNAs of the hypoxia signaling pathway miScript® miRNA PCR Array.

Results. Based on the statistical analysis of the data, it was found that the expression of hsa-miR-15b-5p in the blood plasma of the subjects does not depend on physical activity, but increases when taking cobalt preparations.

Conclusions. The difference in expression levels during anaerobic exercise-induced hypoxia and cobalt-induced hypoxia makes hsa-miR-15b-5p a potential candidate to be a marker of erythropoiesis-stimulating agent abuse.

Keywords: cobalt, qPCR-RT, microRNA, doping control, erythropoiesis stimulants

For citation: Postnikov P.V., Radus F.V., Efimova Yu.A., Pronina I.V. Determination of possible microRNA-markers of cobalt abuse by real-time qPCR using hypoxia signaling pathway panels. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):65–74 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-65-75>

ВВЕДЕНИЕ

Соединения кобальта(II) до 80-х гг. XX века часто использовались для лечения различных форм анемий [1–3]. Механизм их действия связан с активацией транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (англ. hypoxia-inducible factor (HIF)), приводящего к увеличению экспрессии гена эритропоэтина, ключевого регулятора выработки красных кровяных клеток – эритроцитов и увеличению кислородной емкости крови [4–6]. Однако при более детальном изучении возникающих вследствие приема больших доз кобальта серьезных побочных эффектов – острых отравлений, нарушений сердечного ритма, психических расстройств, а также стимуляции канцерогенеза [7–10], их использование для клинических целей прекратилось, им на смену пришли препараты рекомбинантных эпоэтинов [11]. Несмотря на это, профессиональные спортсмены используют различные биодобавки, содержащие кобальт, и даже суспензию хлорида кобальта(II) для повышения толерантности к физической нагрузке и аэробной выносливости, что может давать

конкурентные преимущества. Кобальт включен в Запрещенный список¹ Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) и относится к «активаторам гипоксия-индуцируемого фактора» в соответствии со статьей S2 «Пептидные гормоны, факторы роста, подобные субстанции и миметики».

По состоянию на сегодняшний день лишь немногие антидопинговые лаборатории используют прямые методы определения кобальта: масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) [12–15], жидкостную хроматографию с tandemной масс-спектрометрией [16, 17] или их комбинацию, а большинство и вовсе не включили эти подходы в свой методологический арсенал, что приводит к возникновению проблемы выявления факта злоупотребления солями этого элемента в качестве допингового агента. Помимо этого, ВАДА до сих пор не установило максимально допустимую пороговую концентрацию этого

¹ WADA Prohibited List 2022. URL: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2022list_final_en.pdf. Дата обращения 10.11.2022. / Accessed November 10, 2022.

элемента в биожидкостях и какие-либо критерии идентификации, что осложняет интерпретацию полученных результатов. В ряде работ [15, 18, 19] использован подход, основанный на сравнении соотношения уровня витамина В12 – источника кобальта, присутствующего в организме в естественном состоянии, измеренного иммунохимически, и концентрации общего кобальта, измеренной методом ИСП-МС. Несмотря на то, что данный подход действительно перспективен и может косвенно выявить наличие солей кобальта в организме, он довольно трудоемок для широких скрининговых исследований. Кроме того, несколько научных статей посвящены изучению эритропоэтических эффектов при приеме низких доз неорганического кобальта [4, 20]. Программа гематологического модуля биологического паспорта спортсмена (БПС)² позволяет косвенно определить возможные манипуляции с кровью и факт приема некоторых эритропоэстимулирующих агентов (ЭСА) за счет резкого увеличения концентрации гемоглобина, падения процентного содержания ретикулоцитов и анализа ряда других параметров. Однако установить, являются ли изменения в крови результатом высотных тренировок спортсменов или следствием приема запрещенных препаратов, не представляется возможным.

В связи с вышеперечисленным, существует необходимость разработки нового аналитического подхода косвенного определения злоупотребления солями кобальта, основанного на изменении профилей экспрессии микроРНК как следствия приема препаратов, содержащих кобальт. Такие изменения профилей малых некодирующих РНК крови могут выступать в качестве более ранних высокочувствительных маркеров ответа на физиологический или патологический стимул, чем биохимические [21–24].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы для исследования

Для исследования брали образцы плазмы крови добровольцев ($n = 10$), ведущих активный образ жизни, в возрасте 22–35 лет (контрольная группа), плазмы крови спортсменов, выступающих в дисциплине «спортивная ходьба» (группа 1), плазмы крови тех же добровольцев после приема биодобавки «Кобальт DS®»

² WADA Athlete biological passport operating guidelines. URL: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_abp_v8_final.pdf. Дата обращения 15.11.2022. / Accessed November 15, 2022.

(Dr. Skalny, Россия) (группа 2) в течение 20 суток в количестве в 4 раза превышающей рекомендуемую дозировку (1 таблетка — 200 мкг аспарагината кобальта) после приема пищи. Для получения плазмы образцы венозной крови, взятой натощак, центрифугировали 10 мин при температуре 20 °С со скоростью 1500 об/мин на центрифуге Rotixa 50 RS (*Hettich Zentrifugen*, Германия). Весь объем плазмы отбирали и замораживали при –20 °С до исследований.

Добровольцы были проинформированы о целях эксперимента, от них было получено письменное согласие на использование их биологического материала в научных целях, исследование не противоречит Хельсинкской декларации³ и одобрено локальным комитетом по этике Московского научно-практического центра медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины Департамента здравоохранения г. Москвы. Образцы плазмы крови спортсменов отбирали согласно пункту 5.3.12.2 Международного Стандарта для Лабораторий⁴ и пункту 6.3 Всемирного антидопингового кодекса из архива лаборатории. Образцы крови добровольцев отбирали по правилам сбора образцов по программе БПС в вакуумные пробирки BD Vacutainer® Plus ЭДТА (K2EDTA) (*Becton Dickinson*, США) для гематологических исследований.

Выделение микроРНК из образцов плазмы крови

МикроРНК выделяли из 2 мл плазмы при помощи набора PAXgene Blood miRNA Kit (*PreAnalytiX*, Швейцария) по протоколу производителя с некоторыми модификациями. Внесение в стандартную методику изменений было необходимо в связи с тем, что кровь собирали не в специализированные пробирки PAXgene (*QIAGEN*, Германия), а в пробирки BD Vacutainer® Plus (*Becton Dickinson*, США). Использовались следующие модификации: 2 мл плазмы смешивали с 2 мл денатурирующего буферного раствора (2.7 М тиоцианата гуанидина, 1.3 М тиоцианата аммония, 100 мМ ацетата натрия, 5 мМ ЭДТА, pH 4.0), инкубировали при температуре 20–25 °С 20 мин, центрифугировали 10 мин при 14000g, оса-

³ Declaration of Helsinki of the World Medical Association. URL: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>. Дата обращения 15.11.2022. / Accessed November 15, 2022.

⁴ International Standard for Laboratories URL: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf. Дата обращения 15.11.2022. / Accessed November 15, 2022.

док промывали дважды, используя 2 мл деионизованной воды. После второй промывки осадок растворяли в 350 мкл буферного раствора BM1 из указанного выше набора, далее выделение микроРНК вели по протоколу производителя, смывали микроРНК с колонок двумя объемами по 40 мкл деионизованной воды.

Измерение концентрации микроРНК проводили с использованием флуориметра Fluo 100 (*Hangzhou Allsheng Instruments*, Китай) согласно инструкции. Выделенную микроРНК хранили при температуре -20°C для дальнейшего использования.

Проведение обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора miScript[®] II RT Kit (*QIAGEN*, Германия) с использованием буферного раствора 5×miScript HiSpec Buffer по протоколу производителя на приборе C1000 Touch Thermal Cycler (*Bio-Rad*, США), для реакции брали 200 нг микроРНК, конечный объем реакционной смеси 20 мкл. Полученную кДНК хранили при -20°C . Перед постановкой количественной ПЦР кДНК разводили добавлением 200 мкл деионизованной воды. Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени проводили на ДНК-амплификаторе CFX96 (*Bio-Rad*, США) с помощью наборов miScript[®] SYBR[®] Green PCR Kit (*QIAGEN*, Германия) и панелей для исследования профилей экспрессии зрелых микроРНК сигнального пути гипоксии Hypoxia Signaling Pathway miScript[®] miRNA PCR Array (*QIAGEN*, Германия). Программа ПЦР: инициация 95°C , 15 мин, 40 циклов ($94^{\circ}\text{C} - 15\text{ с}$, $55^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$, $70^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$). Контроли прохождения обратной транскрипции и ПЦР, а также референсные гены включены в состав панели.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения CFX Maestro Software (*Bio-Rad*, США) и онлайн программного обеспечения GeneGlobe (*QIAGEN*, Германия). Данные проведенных экспериментов объединяли в одно исследование. В работе определяли нормализованную экспрессию микроРНК (ΔCt), нормализацию проводили на референсные РНК, содержащиеся в использованной панели Hypoxia Signaling Pathway miScript[®] miRNA PCR Array (*QIAGEN*, Германия). По коэффициентам вариации (CV) и значениям среднего геометрического (M -Value) в качестве референсных были

выбраны SNORD68 (CV 0.3690, M 0.8174), SNORD95 (CV 0.0282, M 0.5652), SNORD96a (CV 0.3951, M 0.8783) со средними величинами стабильности CV 0.2641 и M 0.7537, т.к. для гетерогенных образцов рекомендуется использовать референсные РНК с $\text{CV} < 0.5$ и $M < 1.0$. При расчете относительной нормализованной экспрессии микроРНК ($\Delta\Delta\text{Ct}$) использовались усредненные значения ΔCt опытной группы против контрольной группы. Значимыми признавались величины $\Delta\Delta\text{Ct} < 2^{-2}$ и $2^2 < \Delta\Delta\text{Ct}$ ($p < 0.01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ЭСА чаще применяются в видах спорта, ориентированных на продолжительные физические нагрузки и длинные дистанции (легкая атлетика, велоспорт, спортивная ходьба, биатлон и др.), для улучшения снабжения органов и тканей организма кислородом, и увеличения выносливости. Однако, следует учитывать, что у атлетов развивается вызванное физической нагрузкой состояние гипоксии, которое само по себе способствует активации HIF и запуску процесса эритропоэза. Поэтому обнаружение разницы в маркерах сигнального пути гипоксии при анаэробной физической нагрузке и при применении запрещенного ВАДА кобальта для современного допинг-контроля весьма актуально.

В большей части исследованных образцов экспрессия микроРНК изменялась незначительно или достоверность полученных данных была ниже $p = 0.01$. На рис. 1 представлено сравнение уровней экспрессии циркулирующих в плазме микроРНК сигнального пути гипоксии в экспериментальных группах 1 (спортсмены) и 2 (добровольцы, принимающие биологически активную добавку (БАД) «Кобальт DS[®]»).

По оси абсцисс отложен логарифм ($\text{Log } 2$) отношения уровня экспрессии микроРНК в группе 2 к уровню экспрессии той же микроРНК в группе 1. Сплошная вертикальная линия соответствует отсутствию изменения уровня экспрессии, пунктирные вертикальные линии соответствуют снижению или увеличению уровня экспрессии в группе 2 по сравнению с группой 1 в 4 раза.

По оси ординат отложен отрицательный логарифм ($-\text{Log } 10$) значения p (p -value), отражающий значимость полученных результатов. Сплошная горизонтальная линия соответствует $p = 0.01$. Таким образом, изменения уровня экспрессии, отраженные на данном графике над сплошной горизонтальной линией, являются статистически значимыми, а отраженные под ней – не обладают статистической значимостью.

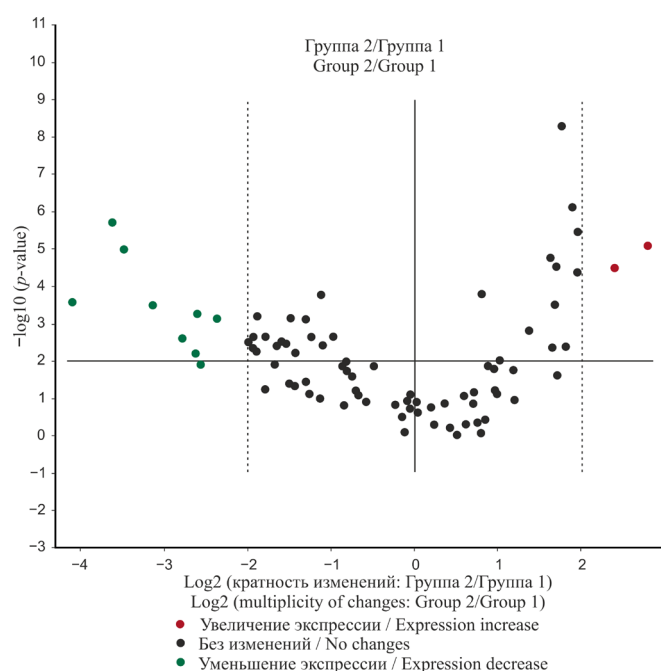


Рис. 1. Сравнение уровней экспрессии циркулирующих в плазме микроРНК сигнального пути гипоксии в экспериментальных группах 1 (спортсмены) и 2 (добровольцы, принимающие БАД «Кобальт DS®»).

Fig. 1. Comparison of expression levels of microRNAs of the hypoxia signaling pathway circulating in plasma in experimental groups 1 (athletes) and 2 (volunteers taking dietary supplements Cobalt DS®).

На основании анализа данных по уровням циркулирующих в плазме микроРНК в трех исследованных группах были отобраны девять микроРНК, экспрессия которых стабильно определяется во всех образцах и изменяется в условиях гипоксии, как вызванной аэробными нагрузками, так и вызванной приемом БАД, содержащей кобальт (табл.). К ним относятся miR-135a-5p, miR-15b-5p, miR-199b-5p, miR-200b-3p, miR-203a-3p, miR-204-5p, miR-26a-5p, miR-449a, miR-504-5p (рис. 2).

На рис. 2 видно, что семь (miR-135a-5p, miR-199b-5p, miR-200b-3p, miR-203a-3p, miR-204-5p, miR-449a, miR-504-5p) из девяти выбранных микроРНК у спортсменов экспрессируются на более высоком уровне, чем у добровольцев, не занимающихся спортом. После приема «Кобальт DS®» уровень их экспрессии также повышен, но значительно ниже, чем у спортсменов.

С нашей точки зрения, использование данных семи микроРНК в качестве маркеров применения ЭСА будет практически затруднено. Это возможно только при отслеживании уровней их экспрессии во времени подобно программе гематологического модуля БПС. Уровень miR-26a-5p между группами меняется незначительно.

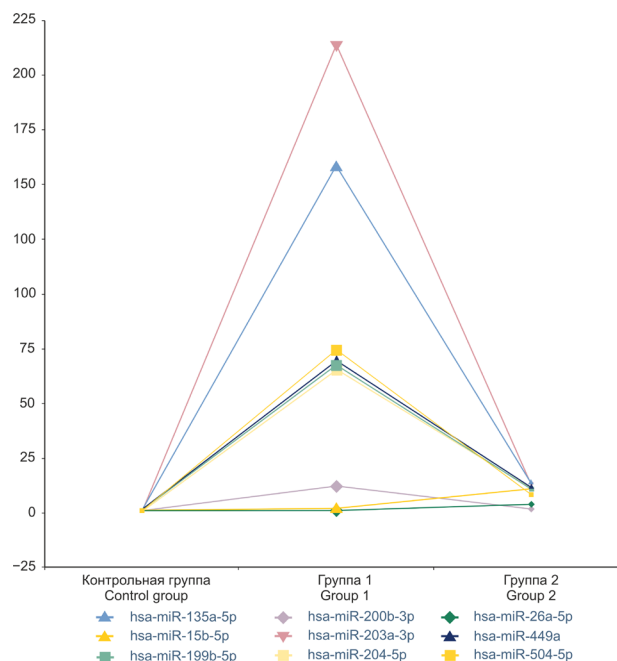


Рис. 2. Линейная диаграмма, отражающая изменение экспрессии выбранных циркулирующих микроРНК в различных группах. Исходя из данных, представленных на рисунке видно, что в группе 2 наблюдается увеличение экспрессии всех микроРНК, кроме miR-15b-5p, чья экспрессия остается неизменной, но при приеме БАД «Кобальт DS®» она увеличивается.

Fig. 2. Line diagram showing changes in the expression of selected circulating miRNAs in different groups. Based on the data presented in the figure, it can be seen that in group 2, there is an increase in the expression of all miRNAs, except for miR-15b-5p, whose expression remains unchanged, but when taking dietary supplements Cobalt DS®, it increases.

Специалистам в области спортивной медицины, непосредственно работающим со спортсменами, также возможно будут интересны hsa-miR-135a-5p и hsa-miR-203a-3p. Уровень данных микроРНК в плазме крови спортсменов в 11.2 (hsa-miR-135a-5p) и 17.1 (hsa-miR-203a-3p) раз выше у спортсменов, чем у добровольцев (табл.). Сравнение уровней данных микроРНК у спортсменов с различным уровнем подготовки и/или у спортсменов разных видов спорта позволило бы предположить возможность их использования как маркеров физической подготовки в целом или маркеров устойчивости к анаэробным нагрузкам, в частности. С научной точки зрения, интересно определить, является ли высокий уровень данных микроРНК генетически обусловленным. Исследования Guo с соавторами [25] показали, что has-miR-135a-5p снижает число апоптотических клеток миокарда и воспаление после инфаркта миокарда за счет ингибирования экспрессии белков воспаления: TNF- α , IL-1 β и IL-6. Также

Таблица. Отношение уровней экспрессии циркулирующих микроРНК в группе 2 (добровольцы, принимающие БАД «Кобальт DS®») к таковому в группе 1 (спортсмены), усредненные данные по группам

Table. The ratio of expression levels of circulating miRNAs in group 2 (volunteers taking dietary supplements Cobalt DS®) to that in group 1 (athletes), group averages

Номер ячейки	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7c-5p	hsa-let-7d-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-let-7f-5p	hsa-let-7g-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-107	hsa-miR-10b-5p
	3.38	2.02	2.59	3.86	3.24	3.69	3.09	1.50	-2.48	-1.06	-5.16	-3.47
B	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-135a-5p	hsa-miR-138-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-148b-3p
	-3.16	1.97	-1.81	1.74	1.84	-11.16	-2.18	-2.18	-1.17	1.01	-1.11	-1.63
C	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-184	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-188-5p
	1.28	1.14	-2.80	6.89	1.41	1.94	-1.80	3.50	-3.18	-2.82	-1.76	-2.48
D	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-203a-3p	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-20a-5p
	3.86	1.62	1.68	1.18	-6.19	-2.40	-3.84	-6.87	-17.09	-6.07	-3.73	2.29
E	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-210-3p	hsa-miR-215-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-224-5p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-26b-5p
	-1.76	-1.50	-2.69	1.52	-1.04	-3.03	-2.15	3.12	1.34	-1.04	5.23	3.25
F	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-320a	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-429
	-1.40	1.73	-3.45	-1.60	-3.82	1.62	1.02	-1.09	-2.70	-1.96	-1.69	-12.29
G	hsa-miR-449a	hsa-miR-451a	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-504-5p	hsa-miR-5p	hsa-miR-877-3p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-935	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-9-5p	hsa-miR-98-5p	hsa-miR-99a-5p
	-5.90	1.79	-2.35	-8.79	2.26	-3.69	1.92	-2.91	3.20	-2.20	-1.02	-3.94

Примечание: А – экспрессия данной микроРНК крайне вариабельна среди индивидуумов не зависимо от того, к какой группе они относятся. Скорее всего данную микроРНК нельзя будет использовать в качестве биологического маркера применения запрещенных веществ; В – экспрессия данной микроРНК относительно низка как в контрольных, так и в экспериментальных образцах. В некоторых образцах данная микроРНК не обнаружена вовсе. Таким образом, возможность использования данной микроРНК в качестве маркера применения ЭСА также маловероятна.

Note: А – the expression of this microRNA is highly variable among individuals, regardless of which group they belong to. Most likely, this microRNA cannot be used as a biological marker for the use of prohibited substances; В – the expression of this miRNA is relatively low in both control and experimental samples. In some samples, this miRNA was not detected at all. Thus, the possibility of using this microRNA as a marker for the use of ESA is also unlikely.

hsa-miR-135a-5p напрямую взаимодействует с ингибитором гипоксией индуцируемого фактора 1 альфа (HIF1AN), снижая его экспрессию и, таким образом, косвенно повышая экспрессию генов, ответственных за процессы остеогенеза [26]. Путем скрининга онлайн-баз данных в работе [27] предсказали и затем доказали экспериментально, что has-miR-135a-5p потенциально может участвовать в регуляции TRPC1 белков (кальциевых каналов

транзитного рецепторного потенциала (TRPC)). TRPC1 является дифференциальным регулятором событий, опосредованных гипоксией. Блокирование TRPC1 уменьшает индуцированную гипоксией аутофагию, что способствует выживанию клеток в условиях гипоксии. Hsa-miR-203a-3p по данным [28] препятствует развитию ишемического инсульта за счет подавления апоптоза, окислительного стресса и воспаления.

Наиболее интересной из 84 исследованных микроРНК нам представляется hsa-miR-15b-5p, т.к. ее экспрессия у спортсменов (группа 1) остается неизменной, как и у добровольцев контрольной группы, а после приема «Кобальт DS®» ее экспрессия заметно выше (группа 2). Ранее hsa-miR-15b-5p уже исследовалась в связи с поиском маркеров устойчивости к «горной болезни», вызывающей отек легких и отек мозга в условиях гипоксии на высотах более 2500 м над уровнем моря [29]. Испытуемые с более высоким начальным уровнем hsa-miR-15b-5p легче переносили условия гипоксии, признаков развития «горной болезни» у них не наблюдалось.

Обнаруженная нами явная разница в уровнях экспрессии при гипоксии, вызванной анаэробной физической нагрузкой, и имитацией гипоксии за счет применения препарата кобальта делает hsa-miR-15b-5p потенциальным претендентом на роль маркера злоупотребления ЭСА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных пилотных исследований по сравнению уровней циркулирующих микроРНК плазмы крови добровольцев, профессиональных спортсменов, задействованных в видах спорта, ориентированных на выносливость, и тех же добровольцев после приема биодобавки, содержащей кобальт, были отобраны микроРНК-кандидаты, экспрессия которых стабильно определялась во всех образцах и изменялась в условиях гипоксии, как вызванной аэробными нагрузками, так и вызванной приемом БАД. Особый интерес, в качестве возможного потенциального маркера косвенного определения активаторов HIF, представляет hsa-miR-15b-5p, экспрессия которой заметно возрастает после 20-дневного применения «Кобальт DS®», но остается неизменной при длительной физической нагрузке. Для уточнения полученных данных

требуется расширение выборки исследуемых образцов. Ввиду отсутствия установленного ВАДА порогового значения для прямого определения концентрации общего кобальта в плазме и моче, поиск новых маркеров злоупотребления допингом ЭСА имеет несомненную практическую значимость для целей допинг-контроля, так как они могут выступать в качестве дополнительного доказательства приема запрещенных миметиков гипоксии.

Вклад авторов

П.В. Постников – формулирование целей и задач, обсуждение экспериментов и результатов, проведение экспериментальных исследований, написание и редактирование текста статьи, правка финальной версии статьи, подготовка материалов к публикации;

Ф.В. Радус – содействие в проведении экспериментальных исследований, обсуждение экспериментов и результатов;

Ю.А. Ефимова – обсуждение экспериментов и результатов, правка финальной версии статьи, подготовка материалов к публикации;

И.В. Пронина – формулирование целей и задач, обсуждение экспериментов и результатов, проведение экспериментальных исследований, написание и редактирование текста статьи, правка финальной версии статьи.

Authors' contributions

P.V. Postnikov – formulation of aims and objectives, discussion of experiments and results, conducting experimental research, writing and editing the text of the article, editing the final version of the article, and preparing materials for publication;

F.V. Radus – assistance in conducting experimental research, discussion of experiments and results;

Yu.A. Efimova – discussion of experiments and results, editing the final version of the article, and preparing materials for publication;

I.V. Pronina – formulation of aims and objectives, discussion of experiments and results, conducting experimental research, writing and editing the text of the article, editing the final version of the article.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Robinson J.C., James III G.W., Kark R.M. The effect of oral therapy with cobaltous chloride on the blood of patients suffering with chronic suppurative infection. *New Engl. J. Med.* 1949;240(19):749–753. <https://doi.org/10.1056/NEJM194905122401902>
2. Ebert B., Jelkmann W. Intolerability of cobalt salt as erythropoietic agent. *Drug Test. Anal.* 2014;6(3):185–189. <https://doi.org/10.1002/dta.1528>

3. Pronina I.V., Mochalova E.S., Efimova Yu. A., Postnikov P.V. Biological functions of cobalt and its toxicology and detection in anti-doping control. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine. Chem. Technol.* 2021;16(4):318–336 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-4-318-336>
4. Hoffmeister T., Schwenke D., Wachsmuth N., Krug O., Thevis M., Byrnes W.C., Schmidt W.F.J. Erythropoietic effects of low-dose cobalt application. *Drug Test Anal.* 2019;11(2):200–207. <https://doi.org/10.1002/dta.2478>

5. Beuck S., Schanzer W., Thevis M. Hypoxia-inducible factor stabilizers and other small-molecule erythropoiesis-stimulating agents in current and preventive doping analysis. *Drug Test. Anal.* 2012;4(11):830–845. <https://doi.org/10.1002/dta.390>
6. Muñoz-Sánchez J., Chánez-Cárdenas M.E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J. Appl. Toxicol.* 2019;39(4):556–570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>
7. Finley B.L., Monnot A.D., Paustenbach D.J., Gaffney S.H. Derivation of a chronic oral reference dose for cobalt. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2012;64(3):491–503. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.08.022>
8. Gault N., Sandre C., Poncy J.-L., Moulin C., Lefaix J.-L., Bresson C. Cobalt toxicity: chemical and radiological combined effects on HaCaT keratinocyte cell line. *Toxicol. in Vitro.* 2010;24(1):92–98. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.027>
9. Catalani S., Rizzetti M.C., Padovani A., Apostoli P. Neurotoxicity of cobalt. *Hum. Exp. Toxicol.* 2012;31(5):421–437. <https://doi.org/10.1177/0960327111414280>
10. Gómez-Arnaiz S., Tate R.J., Grant M.H. Cytotoxicity of cobalt chloride in brain cell lines – a comparison between astrocytoma and neuroblastoma cells. *Toxicol. in Vitro.* 2020;68:104958. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104958>
11. Jelkmann W. Efficacy of recombinant erythropoietins: Is there unity of international units? *Nephrol. Dial. Transpl.* 2009;24(5):1366–1368. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp058>
12. Krug O., Kutscher D., Piper T., Geyer H., Schänzer W., Thevis M. Quantifying cobalt in doping control urine samples – a pilot study. *Drug Test. Anal.* 2014;6(11–12):1186–1190. <https://doi.org/10.1002/dta.1694>
13. Ho E.N.M., Chan G.H.M., Wan T.S.M., Curl P., Riggs C.M., Hurley M.J., Sykes D. Controlling the misuse of cobalt in horses. *Drug Test. Anal.* 2015;7(1):21–30. <https://doi.org/10.1002/dta.1719>
14. Thevis M., Krug O., Piper T., Geyer H., Schanzer W. Solutions Advertised as Erythropoiesis-stimulating Products were Found to Contain Undeclared Cobalt and Nickel Species. *Int. J. Sports Med.* 2016;37(1):82–84. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1569350>
15. Knoop A., Görgens C., Geyer H., Thevis M. Elevated urinary cobalt concentrations identified in routine doping controls can originate from vitamin B₁₂. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2020;34(7):e8649. <https://doi.org/10.1002/rcm.8649>
16. Sobolevsky T., Ahrens B. Measurement of urinary cobalt as its complex with 2-(5-chloro-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the purpose of anti-doping control. *Drug Test. Anal.* 2021;13(6):1145–1157. <https://doi.org/10.1002/dta.3004>
17. Minakata K., Suzuki M., Suzuki O. Application of electrospray ionization tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cobalt in urine. *Anal. Chim. Acta.* 2008;614(2):161–164. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.043>
18. Hillyer L.L., Ridd Z., Fenwick S., Hincks P., Paine S.W. Pharmacokinetics of inorganic cobalt and a vitamin B₁₂ supplement in the Thoroughbred horse: differentiating cobalt abuse from supplementation. *Equine Vet. J.* 2018;50(3):343–349. <https://doi.org/10.1111/evj.12774>
19. Postnikov P.V., Ordzhonikidze Z.G., Badtieva V.A., Turin I.A., Pavlov V.I. Determination of cobalt in plasma blood samples by the ICP-MS method after oral intake of low doses of Co-containing dietary supplements. *Voprosy pitaniia = Problems of Nutrition.* 2022;91(6):100–109.
20. Hoffmeister T., Schwenke D., Krug O., Wachsmuth N., Geyer H., Thevis M., Byrnes W.C., Schmidt W.F.J. Effects of 3 Weeks of Oral Low-Dose Cobalt on Hemoglobin Mass and Aerobic Performance. *Front. Physiol.* 2018;9:1289. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01289>
21. Postnikov P.V., Efimova Yu. A., Pronina I.V. Circulating MicroRNAs as a New Class of Biomarkers of Physiological Reactions of the Organism to the Intake of Dietary Supplements and Drugs. *Microna.* 2022;11(1):25–35. <http://dx.doi.org/10.2174/2211536611666220422123437>
22. Пронина И.В., Постников П.В., Павлов В.И., Орджоникидзе З.Г. Сравнение профилей экспрессии микроРНК атлетов, выступающих в видах спорта, ориентированных на выносливость, и добровольцев, не занимающихся спортом, с использованием панели сигнального пути гипоксии. *Спортивная медицина наука и практика.* 2022;12(2):13–21. <https://doi.org/10.47529/2223-2524.2022.2.10>
- [Pronina I.V., Postnikov P.V., Pavlov V.I., Ordzhonikidze Z.G. Comparison of micron expression profiles of athletes involved in endurance sports and non-athletic volunteers using a signaling pathway panel. *Sportivnaya meditsina nauka i praktika = Sport Medicine: research and Practice.* 2022;12(2):13–21 (in Russ.). <https://doi.org/10.47529/2223-2524.2022.2.10>]
23. Sessa F., Salerno M., Di Mizio G., Bertozzi G., Messina G., Tomaiuolo B., Pisanelli D., Maglietta F., Ricci P., Pomara C. Anabolic Androgenic Steroids: Searching New Molecular Biomarkers. *Front. Pharmacol.* 2018;9:1321. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01321>
24. Leuenberger N., Saugy M. Circulating microRNAs: The Future of Biomarkers in Anti-doping Field. In: Santulli G. (Ed.). *MicroRNA: Medical Evidence. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2015;888:401–408. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_20
25. Guo X.-Y., Liu Q.-L., Liu W., Cheng J.-X., Li Z.-J. Effect and mechanism of miR-135a-5p/CXCL12/JAK-STAT axis on inflammatory response after myocardial infarction. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020;24(24):12912–12928. https://doi.org/10.26355/eurev_202012_24195
26. Yin N., Zhu L., Ding L., Yuan J., Du L., Pan M., Xue F., Xiao H. MiR-135-5p promotes osteoblast differentiation by targeting HIF1AN in MC3T3-E1 cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2019;24:51. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0177-6>
27. Zhang Z., Ren L., Zhao Q., Lu G., Ren M., Lu X., Yin Y., He S., Zhu C. TRPC1 exacerbate metastasis in gastric cancer via ciRS-7/miR-135a-5p/TRPC1 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020;529(1):85–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.181>
28. Li Y., Peng B., Li Y., Huang A., Peng Y., Yu Q., Li Y. MiR-203a-3p/153-3p improves cognitive impairments induced by ischemia/reperfusion via blockade of SRC-mediated MAPK signaling pathway in ischemic stroke. *Chem. Biol. Interact.* 2022;358:109900. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109900>
29. Huang H., Dong H., Zhang J., Ke X., Li P., Zhang E., Xu G., Sun B., Gao Y. The Role of Salivary miR-134-3p and miR-15b-5p as Potential Non-invasive Predictors for Not Developing Acute Mountain Sickness. *Front. Physiol.* 2019;10:898. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00898>

Об авторах:

Постников Павел Викторович, к.х.н., начальник отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (105005, Россия, Москва, Елизаветинский переулок, д. 10, стр. 1). E-mail: postnikov@dopingtest.ru. Scopus Author ID 57021610900, SPIN-код РИНЦ 7251-9937, <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>

Радус Федор Валерьевич, ассистент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: radus20@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0938-9609>

Ефимова Юлия Александровна, к.х.н., доцент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: efimova_yulia@bk.ru. Scopus Author ID 25228417800, <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

Пронина Ирина Валерьевна, к.б.н., главный специалист отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (105005, Россия, Москва, Елизаветинский переулок, д. 10, стр. 1); старший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (125315, Россия, Балтийская ул., д. 8). E-mail: zolly_sten@mail.ru. Scopus Author ID 8161867200, ResearcherID G-3951-2014, SPIN-код РИНЦ 5706-2369, <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

About the authors:

Pavel V. Postnikov, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia). E-mail: postnikov@dopingtest.ru. Scopus Author ID 57021610900, RSCI SPIN-code 7251-9937, <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>

Fedor V. Radus, Assistant, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: radus20@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0938-9609>

Yuliya A. Efimova, Cand. Sci. (Chem.), Assistant Professor, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: efimova_yulia@bk.ru. Scopus Author ID 25228417800, <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

Irina V. Pronina, Cand. Sci. (Chem.), Main Specialist, Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia); Senior Researcher, Pathogenomics and Transcriptomics Laboratory, Institute of General Pathology and Pathophysiology (8, ul. Baltiiskaya, Moscow, 125315, Russia). E-mail: zolly_sten@mail.ru. Scopus Author ID 8161867200, ResearcherID G-3951-2014, RSCI SPIN-code 5706-2369, <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

*Поступила: 22.12.2022; получена после доработки: 27.12.2022; принята к опубликованию: 30.01.2023.
The article was submitted: December 22, 2022; approved after reviewing: December 27, 2022; accepted for publication: January 30, 2023.*

Отпечатано в МИРЭА – Российском технологическом
университете.

119454, РФ, Москва, пр-т Вернадского, д. 78.

Подписано в печать 28.02.2023

Формат 60×90/8. Печать цифровая.

Уч.-изд. листов 9.5.

Тираж 100 экз. Заказ № 118.

Подписку на печатную версию журнала

Тонкие химические технологии = *Fine Chemical Technologies*
можно оформить через ООО «Агентство «Книга-Сервис»,

www.akc.ru.

Подписной индекс: **36924**.

Printed in MIREA – Russian Technological
University.

78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russian Federation.

Signed to print on February 28, 2023.

Format 60×90/8. Digital print.

C.p.l. 9.5.

100 copies. Order No. 118.

Subscription to the

Tonkie Khimicheskie Tekhnologii = *Fine Chemical Technologies*
printed version can be made through the *Kniga-Servis* Agency,

www.akc.ru.

Subscription index: **36924**.

